



**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Cirugía**

**PLACA DE CRECIMIENTO:  
ALOTRASPLANTE SIMPLE Y  
ALOTRASPLANTE COMBINADO CON  
HUESO. MODELO EXPERIMENTAL  
EN RATA**

**TESIS DOCTORAL**

**Alberto Touza Fernández**

**MADRID 2012**



**Trabajo dirigido por los profesores**

**M<sup>a</sup> JESÚS DELGADO MARTOS**

**ENRIQUE GIL GARAY**

**JOSÉ JAVIER SÁNCHEZ HERNÁNDEZ**







Facultad de Medicina

Departamento de Cirugía

**ENRIQUE GIL-GARAY**, Doctor en Medicina y Cirugía, Jefe de Servicio del Hospital Universitario La Paz, Profesor Titular del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

**M<sup>a</sup> JESÚS DELGADO MARTOS**, Doctor en Ciencias Biológicas, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (Laboratorio de Biología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón), Profesor de la Universidad Francisco de Vitoria de Madrid.

**JOSE JAVIER SÁNCHEZ HERNÁNDEZ** Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor titular del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

**CERTIFICAN QUE:**

El trabajo titulado: “PLACA DE CRECIMIENTO: ALOTRASPLANTE SIMPLE Y ALOTRASPLANTE COMBINADO CON HUESO. MODELO EXPERIMENTAL EN RATA”, presentado por D. Alberto Touza Fernández, ha sido realizado bajo nuestra dirección y consideramos que reúne las condiciones para ser leído y defendido como TESIS DOCTORAL en la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste a efectos académicos, firmamos el presente CERTIFICADO en Madrid, a 8 de Mayo del año dos mil doce.

Enrique Gil Garay

M<sup>a</sup> Jesús Delgado

José Javier Sánchez Hernández



*A mis Padres, por su entrega. Sin  
vosotros nada de esto hubiera sido posible.*

*A Alicia, eres la mejor.*

*A Silvia por su apoyo incondicional y  
su amor, te debo tanto.*



## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi agradecimiento a las personas que han colaborado en la realización de esta tesis:

Dr Emilio Delgado, mi maestro. Gracias por todo lo que me has enseñado, por tu infinita paciencia y por transmitirme el entusiasmo hacia nuestra profesión.

Dr Enrique Gil-Garay, por todo el apoyo recibido durante este tiempo

Mi reconocimiento a la Dra Delgado-Martos. Gracias por todo el trabajo realizado y por tus sabios consejos.

Dr José Javier Sánchez por su colaboración en este trabajo.

Dra Fernández-Criado. Sin su generosidad y ayuda este proyecto no se hubiera podido llevar a cabo. Gracias

Dr Fernando Canillas, por sus consejos y ayuda a la hora de afrontar ese reto.

Al personal del Gabinete Veterinario de la UAM: David Muñoz, por su ayuda con el manejo y gestión de los animales de laboratorio. Miguel Andrés, José Manuel Badajoz, Santiago García, Marta Miró. Gracias por vuestra ayuda con los animales de experimentación y por vuestra compañía durante estos años. Eli López Torres por su ayuda en la preparación histológica de las muestras.

Al personal de la Biblioteca de la Facultad de Medicina de la UAM M<sup>a</sup> Pilar Barredo y Mercedes Echevarría por su ayuda con el material bibliográfico.

Dr Javier Pizones, por transmitirme la inquietud hacia la investigación, gracias por tu apoyo.

A los residentes del servicio de Traumatología del Hospital Universitario de Getafe por el apoyo que he recibido de vuestra parte y por todo lo que he aprendido de vosotros.

Al Dr García-Navarrete y a los adjuntos del servicio de Traumatología del Hospital Universitario de Getafe. Gracias por iniciarme en el apasionante mundo de la Cirugía Ortopédica.

A mis padres Carmen y Carlos, por vuestra ayuda, consejos y apoyo en todo en todo momento.

A Alicia, por tu cariño y ayuda.

A Silvia, por todo el tiempo que te he robado, por tu comprensión y ánimo en los momentos menos buenos.



## ÍNDICE



ÍNDICE .....	12
ABREVIATURAS.....	120
1 INTRODUCCIÓN.....	23
1.1 LA PLACA DE CRECIMIENTO.....	26
1.1.1 Zonas de la placa de crecimiento .....	27
1.1.2 Anillo pericondral .....	31
1.1.3 Vascularización de la placa de crecimiento .....	32
1.1.4 Crecimiento de la placa de crecimiento .....	35
1.1.5 Función y regulación de la placa de crecimiento .....	36
1.1.6 Resistencia a la hipoxia de la placa de crecimiento .....	42
1.1.7 Muerte celular .....	43
1.1.8 Cierre fisario.....	43
1.2 TRASPLANTE DE PLACA DE CRECIMIENTO .....	44
1.2.1 Problemas del trasplante de placa de crecimiento .....	44
1.2.2 Evolución histórica del trasplante de placa de crecimiento .....	45
1.2.3 Aspectos inmunológicos del trasplante de placa de crecimiento y de los alotrasplantes de hueso .....	50
1.2.4 Conservación de la placa de crecimiento .....	52
1.3 CÉLULAS TRONCALES O CÉLULAS MADRE Y OSTEOPROGENITORES .....	54
1.4 MODELOS EXPERIMENTALES EN PATOLOGÍA OSTEOARTICULAR.....	56
1.5 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO .....	59
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	62
2.1 HIPÓTESIS.....	63

2.2	OBJETIVOS .....	65
3	PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO .....	66
4	MATERIAL Y MÉTODO.....	71
4.1	MATERIALES Y REACTIVOS .....	72
4.1.1	Animales .....	72
4.1.2	Condiciones de estabulación .....	72
4.1.3	Aparatos.....	73
4.1.4	Materiales.....	73
4.1.5	Medios de criopreservación y medios de cultivo.....	74
4.1.6	Soluciones y reactivos .....	75
4.1.7	Distribución y número de animales utilizados .....	76
4.2	MÉTODOS .....	83
4.2.1	MODELO EXPERIMENTAL 1: trasplante avascular de placa de crecimiento fresco, crioconservado con o sin células .....	83
4.2.1.1	Animales: anestesia tratamiento y eutanasia .....	83
4.2.1.2	Creación del banco de placas de crecimiento criopreservadas.....	84
4.2.1.3	Intervención quirúrgica .....	84
4.2.1.4	Aislamiento y cultivo de células MSC. Tratamiento con células MSC .....	89
4.2.1.5	. Protocolo postoperatorio.....	90
4.2.1.6	Eutanasia de los animales.....	90
4.2.1.7	Análisis clínico de la extremidad.....	90
4.2.1.8	Análisis radiográfico.....	91
4.2.1.9	Análisis estadístico .....	98

4.2.1.10	Método histológico .....	99
4.2.1.11	Método histométrico .....	100
4.2.2	MODELO EXPERIMENTAL 2: aloinjerto combinado de placa de crecimiento y radio distal .....	101
4.2.2.1	Intervención quirúrgica del modelo experimental de aloinjerto .....	101
4.2.2.2	Grupos de ensayo del modelo.....	101
4.2.2.3	Protocolo postoperatorio .....	107
4.2.2.4	Eutanasia de los animales.....	107
4.2.2.5	Análisis clínico de la extremidad .....	107
4.2.2.6	Análisis radiográfico .....	107
4.2.2.7	Análisis histológico .....	109
5	RESULTADOS .....	110
5.1	GRUPO CONTROL .....	111
5.1.1	Resumen Grupo Control .....	113
5.2	hueso supra-placa .....	113
5.2.1	Hueso supra-placa, en placa de crecimiento normal .....	113
5.2.2	Hueso supra-placa en placa de crecimiento con alteración mecánica (cúbito).....	115
5.2.3	Hueso supra-placa en placa de crecimiento trasplantadas .....	116
5.3	resultados del grupo de resección de la placa de crecimiento (grupo D) .....	117
5.3.1	Estudio clínico y radiológico (Fig. 5.11): .....	117
5.3.2	Estudio histológico .....	118

5.3.3	Resumen del grupo de resección de la placa de crecimiento (Grupo D) .....	120
5.4	OBJETIVO 1. ALOTRASPLANTE SIMPLE DE PLACA DE CRECIMIENTO.....	121
5.4.1	Trasplante en fresco de 6 semanas de evolución (Esquema 1)....	121
5.4.1.1	Estudio clínico y radiológico .....	121
5.4.1.2	Estudio histológico.....	123
5.4.1.3	Resumen del grupo trasplante en fresco de 6 semanas de evolución .....	127
5.4.2	Trasplante en fresco de de 12 semanas de evolución.....	127
5.4.2.1	Estudio clínico y radiológico .....	127
5.4.2.2	Estudio histológico.....	129
5.4.2.3	Resumen del grupo trasplante en fresco de 12 semanas de evolución .....	133
5.4.3	Trasplante en fresco con administración de células (MSC) de 6 semanas de evolución (esquema 3) .....	133
5.4.3.1	Estudio clínico y radiológico .....	133
5.4.3.2	Estudio histológico.....	135
5.4.3.3	Resumen del grupo trasplante en fresco con administración de células (MSC) de 6 semanas de evolución.....	137
5.4.4	Trasplante en fresco con administración de células (MSC) de 12 semanas de evolución .....	137
5.4.4.1	Estudio clínico y radiológico .....	137
5.4.4.2	Estudio histológico.....	139
5.4.4.3	Resumen del grupo trasplante en fresco con administración de células (MSC) de 12 semanas de evolución...	139

5.4.5	Estudio comparativo entre los grupos de trasplante en fresco de 6 y 12 semanas con los grupos de trasplante en fresco con aporte de células de 6 y 12 semanas .....	140
5.4.5.1	Estudio comparativo, con y sin células, del trasplante en fresco de 6 semanas de evolución.....	140
5.4.5.2	Estudio comparativo, con y sin células, del trasplante en fresco de 12 semanas de evolución.....	142
5.4.6	Trasplante de placa crioconservada de 6 semanas de evolución (esquema 2).....	143
5.4.6.1	Estudio clínico y radiológico .....	144
5.4.6.2	Estudio histológico .....	145
5.4.6.3	Resumen del grupo trasplante de placa crioconservada de 6 semanas de evolución .....	146
5.4.7	Trasplante de placa crioconservada de 12 semanas de evolución .....	146
5.4.7.1	Estudio clínico y radiológico .....	146
5.4.7.2	Estudio histológico .....	148
5.4.7.3	Resumen del grupo trasplante de placa crioconservada de 12 semanas de evolución .....	149
5.4.8	Trasplante de placa crioconservada con administración de células (MSC) de 6 semanas de evolución (esquema 4).....	149
5.4.8.1	Estudio clínico y radiológico .....	149
5.4.8.2	Estudio histológico .....	151
5.4.8.3	Resumen del grupo trasplante de placa crioconservada con administración de células (MSC) de 6 semanas de evolución....	151
5.4.9	Trasplante de placa crioconservada con administración de células (MSC) de 12 semanas de evolución .....	152

5.4.9.1	Estudio clínico y radiológico .....	152
5.4.9.2	Estudio histológico.....	154
5.4.9.3	Resumen del grupo trasplante de placa crioconservada con administración de células (MSC) de 12 semanas de evolución.. .....	155
5.4.10	Estudio comparativo entre los grupos de trasplante crioconservado de 6 y 12 semanas con los grupos de trasplante crioconservado con aporte de células de 6 y 12 semanas .....	155
5.4.10.1	Estudio comparativo, con y sin células, del trasplante crioconservado de 6 semanas de evolución. ....	155
5.4.10.2	Estudio comparativo, con y sin células, del trasplante crioconservado de 12 semanas de evolución. ....	157
5.5	OBJETIVO 2. ALOTRASPLANTE COMBINADO DE PLACA DE CRECIMIENTO Y HUESO.....	159
5.5.1	Trasplante de epífisis (parcial), placa de crecimiento metáfisis y diáfisis (parcial), sin separar (grupo E).....	159
5.5.1.1	Estudio clínico y radiológico .....	160
5.5.1.2	Estudio histológico.....	161
5.5.1.3	Resumen del grupo trasplante de epífisis (parcial), placa de crecimiento metáfisis y diáfisis (parcial), sin separar (grupo E) .... .....	163
5.5.2	Trasplante de placa de crecimiento con metáfisis y diáfisis (parcial) sin separar (Grupo G) .....	163
5.5.2.1	Estudio clínico y radiológico .....	164
5.5.2.2	Estudio histológico.....	165
5.5.2.3	Resumen del grupo trasplante de placa de crecimiento con metáfisis y diáfisis (parcial) sin separar (Grupo G).....	170

5.5.3	Trasplante de placa de crecimiento, metáfisis y diáfisis (parcial) ambos separados del mismo donante (Grupo F) (esquema 8) .....	171
5.5.3.1	Estudio clínico y radiológico .....	171
5.5.3.2	Estudio histológico .....	172
5.5.3.3	Resumen del grupo trasplante de placa de crecimiento, metáfisis y diáfisis (parcial) ambos separados (Grupo F) del mismo donante 176	
5.5.4	Trasplante de placa de crecimiento y diáfisis (parcial) ambos separados de distintos donantes (Grupo C-A) (Esquema 9) .....	177
5.5.4.1	Estudio radiológico .....	177
5.5.4.2	Estudio histológico .....	178
5.5.4.3	Resumen del grupo trasplante de placa de crecimiento y diáfisis (parcial) de distintos donantes (Grupo C-A).....	188
5.5.5	Trasplante de placa de crecimiento y diáfisis de tibia (Grupo C-B) (Esquema 10) .....	189
5.5.5.1	Estudio clínico y radiológico .....	190
5.5.5.2	Estudio histológico .....	191
5.5.5.3	Resumen del grupo trasplante de placa de crecimiento y diáfisis de tibia (Grupo C-B).....	198
6	DISCUSIÓN.....	199
7	CONCLUSIONES.....	227
8	RESUMEN.....	229
9	BIBLIOGRAFÍA.....	231

## **ABREVIATURAS**



<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato.
<b>BMPs</b>	Proteínas morfogenéticas del hueso. <i>Bone Morphogenetic Proteins</i> .
<b>BrdU</b>	Bromo-deoxiuridina.
<b>CEBP-<math>\beta</math>-CHOP</b>	<i>CCAAT/Enhancer-Binding Protein-Beta</i> su proteína homóloga <i>CHOP C/EBP-Homologous Protein</i> .
<b>DMEN</b>	Medio Eagle modificado por Dulbecco básico <i>Dulbecco's modified Eagle Media</i> .
<b>DMEN-LG</b>	Medio Eagle modificado por Dulbecco bajo en glucosa <i>Dulbecco's modified Eagle Media Low Glucose</i> .
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido.
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento fibroblástico <i>Fibroblast Growth Factor</i> .
<b>FGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento fibroblástico, <i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i> .
<b>GH</b>	Hormona de crecimiento, <i>Growth Hormone</i> .
<b>GRUPO D</b>	Grupo de resección de la placa de crecimiento.
<b>GRUPO E</b>	Trasplante completo de epífisis-placa-metáfisis-diáfisis.
<b>GRUPO G</b>	Trasplante de placa y hueso sin separar en fresco.
<b>GRUPO F</b>	Trasplante de placa de crecimiento, metáfisis y diáfisis (parcial) ambos separados.
<b>GRUPO C</b>	Trasplante de placa de crecimiento con distintos donantes de placa y hueso.
<b>H-E</b>	Hematoxilina-Eosina

<b>HIF-1</b>	Factor inducible de hipoxia-1, <i>Hipoxia Inducible Factor-1</i> .
<b>IGF</b>	Factor de crecimiento tipo insulina, <i>Insulin-Like Growth Factor</i> .
<b>Ihh</b>	Factor Indian Erizo, <i>Indian hedgehog</i> .
<b>MSCs</b>	Células mesenquimales, <i>Mesenchymal Stem Cells</i> .
<b>MMP</b>	Metaloproteínasa de la matriz, <i>Matrix Metalloproteinase</i> .
<b>PBS</b>	Solución salina tamponada, <i>Phosphate Buffered Solution</i>
<b>PHDs</b>	Prolil-hidroxilasas.
<b>PTHrP</b>	Proteína relacionada con la hormona paratiroidea , <i>Parathyroid Hormone related Protein</i> .
<b>RANKL</b>	Receptor del Factor nuclear Kappa Beta Ligando.
<b>RUNX2</b>	Factor de transcripción relacionado con Runt 2, <i>Runt-Related Transcription Factor 2</i> .
<b>SOX9</b>	Factor caja relacionada con el factor de alta movilidad Sry-9 <i>Sry related HMG box 9</i> .
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante- $\beta$ <i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i> .
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa, <i>Tumoral Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i> .
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento vascular endotelial, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> .
<b>WNT</b>	Proteínas <i>Wingless</i>

# **1 INTRODUCCIÓN**

Los recientes avances en los protocolos de tratamiento de tumores con quimioterapia y radioterapia, y, en particular de los tumores que afectan al aparato locomotor, permiten que en estos protocolos se incluyan a la vez unos protocolos quirúrgicos con el fin de salvar la extremidad, o la zona afectada, sin tener que realizar grandes amputaciones. Estas técnicas quirúrgicas requieren, a su vez, nuevos procedimientos para sustituir los elementos resecados por otros, a ser posible similares. Estos procedimientos se realizan mediante trasplantes. Las técnicas de trasplantes óseos completos y parciales de cartílago son de uso habitual en clínica. Sin embargo, en lesiones que se localizan cerca de la placa de crecimiento de los huesos largos, y, en las cuales la exéresis del tumor incluye la placa de crecimiento en la pieza resecada, no es posible realizar un procedimiento de sustitución mediante un trasplante de placa de crecimiento. Los trabajos experimentales realizados hasta la actualidad muestran el fracaso de los trasplantes de placa de crecimiento; y, actualmente, se carece en la literatura de un modelo experimental de estudio.

El tema de estudio que se propone en este trabajo es actualizar las posibilidades de desarrollar un modelo experimental de trasplante de placa de crecimiento. La placa de crecimiento es responsable del crecimiento en longitud de los huesos largos. La placa de crecimiento, incluida en el sistema yuxta-epifisario, ha sido objeto de estudio, en distintas tesis, en nuestro laboratorio (Rodríguez 1982, Miralles 1988, Gimenez-Ribotta 1988, Sánchez-Gil 1994, Santos 1998), aportando las bases suficientes para el estudio que se propone. De igual forma, el trasplante de placa de crecimiento y los procedimientos de tratamiento para revitalizar placas de crecimiento, mediante la administración de Células mesenquimales (*Mesenchymal Stem Cells*, MSCs) ha sido objeto de estudio en nuestro laboratorio, siendo los resultados contradictorios (Fuster 2004, Escario 2008, Delgado-Martos 2010). Los resultados mostraron que: el trasplante de placa fracasa, la administración de MSC produce resultados contradictorios; y, que la placa de crecimiento es capaz de funcionar de nuevo tras un periodo en ausencia de vasos.

En el planteamiento de este trabajo se han considerados los dos problemas citados, en el párrafo anterior, y nos hemos preguntado:1 ¿Porqué los resultados contradictorios tras administrar células MSC? y, 2 partiendo del principio, según el cual, los condrocitos tienen la capacidad de sobrevivir en un medio aerobio o anaerobio (hipóxico); y de nuestra experiencia de cultivos de

placas de crecimiento en el laboratorio ¿en qué medida la capacidad hipóxica de los condrocitos se puede aprovechar en desarrollar un modelo experimental? Para responder la primera pregunta, se han repetido ensayos previos. Para responder a la segunda pregunta, se han propuesto varios estudios experimentales en la que el acto quirúrgico sería equiparable a lo que se podría realizar en la clínica. Se proponen procedimientos experimentales de alotrasplantes en fresco avasculares, ortotópicos, combinados de placa de crecimiento y hueso tanto unidos como separados. En uno de estos procedimientos se explora la posible viabilidad de la placa en un medio nutritivo fisiológico, como es el líquido sero-hemático.

Se asumen los límites de este trabajo realizado en un modelo experimental. El primero de ellos es el valor de los hallazgos, sólo se pueden referir al modelo animal y a las condiciones experimentales en que se realizan. En el trabajo se aplican procedimientos técnicos de cirugía y farmacológicos (inmunosupresión) que pueden producir artefactos en los resultados por defecto de aplicación. La consecución de un modelo experimental de alotrasplante combinado de placa de crecimiento y hueso abre el camino a un posterior tratamiento del modelo con diversos factores de crecimiento, aplicación de técnicas de tratamiento con células MSC, o a tratamientos que movilicen las células MSC nativas.

## 1.1 LA PLACA DE CRECIMIENTO

Los huesos de las diferentes partes del esqueleto se desarrollan a partir, en primer lugar del *anlage* cartilaginosa; en segundo lugar tras el desarrollo condral se producen una serie de cambios morfológicos y fisiológicos que dan lugar al proceso de osificación endocondral. Además se describe otro proceso de osificación intramembranosa, que ocurre en los huesos planos por una diferenciación de células mesenquimales embrionarias en osteoblastos formadores de hueso. En contraste a la osificación endocondral que ocurre en el resto del esqueleto por un reemplazamiento o sustitución del molde cartilaginosa por tejido óseo y esto va a ocurrir en la placa de crecimiento (Mackie *et al* 2011). Dentro de la osificación endocondral se describe también la osificación periostal.

Los resultados de estos cambios morfológicos se expresan en los huesos largos en los que se describen tres regiones: epífisis, situada en ambos extremos; diáfisis, situada en la región central; y metáfisis, situada entre la epífisis y la diáfisis. A su vez en la epífisis se pueden identificar las siguientes estructuras, dependiendo del estadio de desarrollo del hueso, pues estos cambios son heterocrónicos. En los estadios precoces, embrio-fetales, se describen: región cartilaginosa, canales condrales y pericondrio. En los estadios tardíos fetales y en el periodo post-natal, se describen unas estructuras que forman el complejo yuxta-epifisario: epífisis, canales condrales, centro de osificación secundario, cartílago articular, placa de crecimiento, pericondrio y anillo pericondral.

La placa de crecimiento es una estructura espacio-temporal situada en los extremos de los huesos largos del organismo a nivel de la región epifisio-metafisaria. En ésta sucede el crecimiento longitudinal del hueso. La población celular es de origen mesenquimático (Brighton *et al* 1984). Está formada por tejido conjuntivo cartilaginosa hialino, en el que se encuentra células (condrocitos) y una matriz extracelular. Los condrocitos se encuentran agrupados en columnas, que se encuentran dispuestas de manera anisotrópica; a su vez, los condrocitos se encuentran también distribuidos en filas. La matriz extracelular está formada por colágeno, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, etc. (Iannotti 1990).

### 1.1.1 Zonas de la placa de crecimiento

Los diferentes estadios a lo largo de la vida de los condrocitos son visibles en distintas zonas en las secciones sagitales de la placa de crecimiento (Fig1.1). En primer lugar se encuentra la zona de reserva o germinativa, donde ocurre una proliferación de condrocitos, lo cual se observa como una presencia de pares de condrocitos en una laguna simple. Le sigue una zona proliferativa donde los condrocitos adquieren una gran actividad secretora y depositan los componentes de la matriz extracelular, estos condrocitos se disponen en columnas paralelas al eje mayor del hueso; donde posteriormente estos condrocitos sufren un proceso de hipertrofia y se mineraliza la zona de la matriz extracelular.



**Figura 1.1** Zonas de la placa de crecimiento.

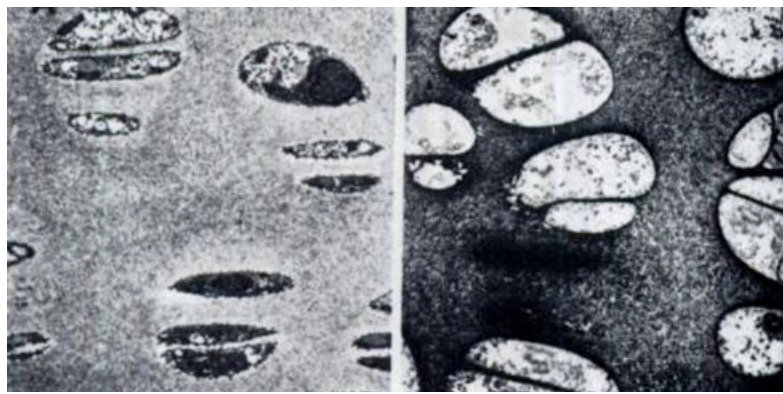
#### **Zona germinativa o de reserva**

La zona germinativa de la placa de crecimiento se encuentra en la zona más cercana al centro de osificación secundario.

Está constituida por células de pequeño tamaño, redondeadas, dispuestas de manera irregular y rodeadas de gran cantidad de matriz extracelular (Fig1.2). Existe un predominio en la relación núcleo/citoplasma a

favor del núcleo, presentan grandes cantidades de retículo endoplasmático (Brighton *et al* 1987, Iannotti *et al* 1992) y acumulan grandes cantidades de lípidos y glucógeno aunque su contenido en calcio intracelular es bajo (Brighton *et al* 1978). La presión local de oxígeno en esta zona es baja ( $20,5 \pm 2,1$  mmHg) (Iannotti 1990).

La matriz extracelular de la zona germinativa es rica en hidroxiprolina (Iannotti 1990) y con bajo contenido en lípidos y glicosaminoglicanos. Las fibras de colágeno tipo II se encuentran dispuestas de manera aleatoria y de forma característica inhiben la calcificación (Robertson *et al* 1990).



**Figura 1.2** Fotografía de microscopía electrónica de células de la zona de reserva (Buckwalter 1985).

### **Zona proliferativa**

La siguiente zona está constituida por células cartilaginosas, condrocitos, de forma ovalada dispuestas en columnas cuyo eje mayor es perpendicular al del hueso (Buckwalter *et al* 1986). El citoplasma de los condrocitos de la zona proliferativa contiene depósitos de glucógeno y en su membrana celular presenta abundantes prolongaciones. La tensión de oxígeno en la zona alta del proliferativo es más alta que en cualquier otra zona ( $57 \pm 5,8$  mmHg).

Los condrocitos de la zona proliferativa sintetizan abundante matriz extracelular. Ésta se divide en tres zonas en función de la ordenación del colágeno. Zona pericelular, rica en proteoglicanos y pobre en colágeno. Zona territorial, con abundantes fibras de colágeno dispuestas de forma circular. Zona interterritorial, con fibras de colágeno dispuestas de forma longitudinal. El colágeno predominante en la zona proliferativa es el tipo II.



La tasa de división de las células del proliferativo es rápida. Algunos autores como Iannotti (Iannotti *et al* 1990) sugieren que la célula progenitora de la placa de crecimiento es la célula más alta de cada columna siendo ésta su función principal. Otra función de las células del proliferativo es la síntesis de matriz extracelular.

### **Zona hipertrófica**

La siguiente zona es la zona hipertrófica. En ella se han descrito, a su vez, varias zonas según las peculiaridades morfológicas en las que se encuentran las células, que en su momento formaron parte de la zona del proliferativo, a saber: zona prehipertrófica, zona de maduración, zona de calcificación provisional y zona de unión condro-ósea. Estas zonas como su nombre indican, definen los estadios por los que pasa un condrocito, hasta llegar el proceso final de muerte celular por apoptosis.

Los condrocitos situados en la zona prehipertrófica adquieren una forma poligonal, aumentan de tamaño, unas cinco a diez veces a su tamaño primitivo en la zona del proliferativo, en esta zona dejan de dividirse. El aumento del tamaño de los condrocitos en la zona prehipertrófica se produce por aumento del volumen intracelular, del contenido de fosfatasa alcalina y por la síntesis de colágeno tipo X.

La zona de maduración del hipertrófico se caracteriza por una diferenciación progresiva del condrocito. Su contenido en calcio intracelular aumenta, así como la síntesis de metaloproteinasas. También disminuye el número de mitocondrias y las reservas de glucógeno comienzan a disminuir. Las metaloproteinasas son liberadas mediante exocitosis y producen el remodelado y mineralización de la matriz extracelular.

En la zona de degeneración la matriz que rodea a los condrocitos se prepara para la calcificación. La zona de calcificación provisional está compuesta por células no viables que presentan fragmentación de la membrana. La matriz extracelular presenta abundantes vesículas; estas vesículas van a participar en el inicio del proceso de mineralización.

Los condrocitos presentes en la zona hipertrófica secretan factores imprescindible para la invasión vascular. El primero es el factor de crecimiento vascular endotelial (*Vascular Endotelial Growth Factor*, VEGF) que promueve la

angiogénesis a nivel de esta zona de la placa. El otro, es el Factor Activador del Receptor del Factor Nuclear Kappa Beta Ligando (RANKL) también es imprescindible para la diferenciación de los osteoclastos (Kishimoto *et al* 2006).

En la zona de unión condro-ósea, los vasos capilares, osteoclastos y células menquimales perivascuales invaden la zona metafisaria y eliminan los septos no calcificados. Las asas capilares que provienen de los vasos de la metáfisis invaden el último septo transversal del cartílago mineralizado para penetrar en las lagunas condrocitarias de la zona hipertrófica, constituyendo la denominada zona de invasión vascular (Aharinejad *et al* 1995). La circulación en este punto se enlentece creándose una zona de estasis vascular que permite el intercambio de nutrientes y factores de crecimiento.

Los osteoclastos presentes en el frente de osificación también son imprescindibles para la degradación de la matriz extracelular. Aunque se ha observado que las primeras células en entrar en las lagunas condrocitarias degradadas son los angioblastos (Deckers *et al* 2002). Recientemente se ha descrito un nuevo tipo celular que acompaña a los vasos en el frente de osificación, estas células perivascuales se han denominado “septoclastos” y su función consiste en ayudar a la degradación de los septos transversos (Gartland *et al* 2009).

En la zona más cercana a la metáfisis se genera nuevo hueso alrededor de las superficies de las trabéculas condrales entre las columnas de la zona hipertrófica, de esta forma se genera la trabécula primaria. Es una zona mecánicamente menos resistente que las regiones adyacentes y es el lugar donde se producen los desprendimientos condroepifisarios. Este hueso es generado por los osteoblastos derivados de las células estromales mesenquimales de la médula ósea adyacente. Éstos depositan matriz ósea en los remanentes de los septos verticales de cartílago formando la nueva estructura trabecular ósea.

En el estadio post-proliferativo los condrocitos se hipertrofian, cambian la expresión de sus genes y modifican la matriz extracelular. Se para la síntesis de colágeno II, y se inicia la expresión de colágeno no fibrilar Tipo X. El condrocito hipertrófico también expresa de forma selectiva metaloproteinasa de la matriz tipo 13 (*Matrix Metalloproteinase 13*, MMP13), una colagenasa capaz de degradar las fibras de colágeno tipo II. La matriz extracelular de la zona

hipertrófica se caracteriza por presentar abundante colágeno de tipo X, implicado en la degradación de la matriz extracelular. La degradación de la matriz extracelular es un proceso necesario para que se produzca la invasión de las células procedentes del centro de osificación. En este proceso son fundamentales las colagenasas MMP13 y MMP9 que destruyen el colágeno (Stickens *et al* 2004, Mackie *et al* 2011).

### 1.1.2 Anillo pericondral

Alrededor de la placa de crecimiento, se describe un anillo de tejido fibroconjuntivo que sirve de soporte a la placa de crecimiento. Rodea a las placas de crecimiento de los huesos con osificación endondral excepto la rótula y los huesos de carpo y tarso. (Shapiro *et al* 1977). En el anillo pericondral se definen dos zonas, según la morfología de las células y su ubicación. Éstas son el surco de Ranvier y el anillo fibroso de LaCroix.

El surco de Ranvier corresponde a una zona triangular, próxima a la región proliferativa de la placa de crecimiento, constituida por células, presumiblemente progenitoras de condrocitos, situadas en el borde superior del anillo. El anillo fibroso de Lacroix forma una vaina alrededor de la unión condro-ósea que se extiende desde la zona del proliferativo hasta la metáfisis. Posee una capa interna de osteoblastos que forman hueso membranoso dando lugar a la formación de una barra ósea. A nivel metafisario la barra es reabsorbida por osteoclastos. Por la zona externa del anillo se describe una capa externa formada por fibroblastos y tejido fibroconjuntivo.

El anillo fibroso de LaCroix es una banda de tejido fibroso que aporta soporte mecánico a la placa en respuesta a la compresión, tensión o cizallamiento. Las fibras de colágeno del anillo se encuentran en contigüidad, pero no continuación, con el periostio y con el pericondrio.

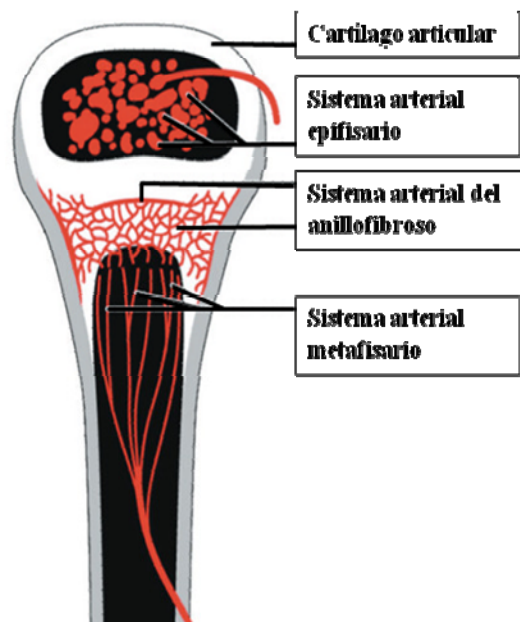
La vascularización del anillo pericondral se realiza mediante arterias que penetran el pericondrio y periostio desde la musculatura adyacente y mediante la arteria circular del surco de Ranvier.

La función principal del anillo pericondral es la de soporte mecánico. Gracias al tejido fibroso y a la barra ósea la estructura columnar de la placa puede mantenerse frente a las fuerzas de compresión axial. También produce

factores de crecimiento (Serra *et al* 1999) para la placa y posee una función de modelado metafisario llevada a cabo por los osteoclastos de la barra ósea (Siffert *et al* 1966).

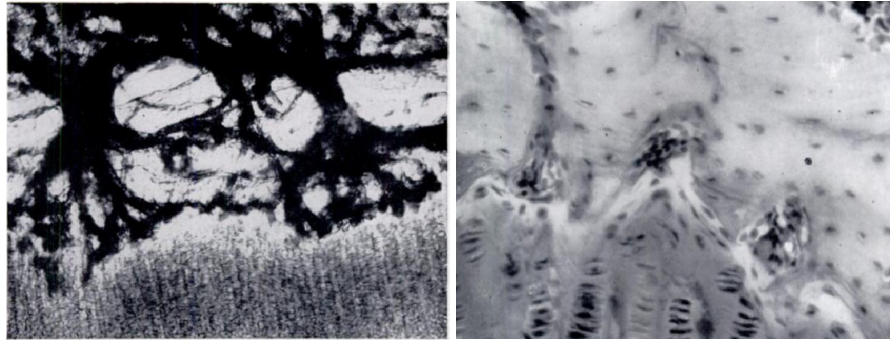
### 1.1.3 Vascularización de la placa de crecimiento

La placa de crecimiento es una estructura avascular, aneural y alinfática que se nutre mediante un sistema de irrigación arterial con tres patrones vasculares (Farnum *et al* 2006). El aporte vascular a la placa de crecimiento fue descrito por Ranvier (Ranvier *et al* 1889). Se compone de sistema epifisario, metafisario y un sistema arterial circular a lo largo del surco de Ranvier. (Fig 1.3)



**Figura 1.3** Diagrama en el que se observan los distintos sistemas arteriales que nutren a la placa de crecimiento.

Trueta (Trueta *et al* 1960) describe los dos patrones vasculares que nutren a la placa de crecimiento. Describe el sistema epifisario y el sistema metafisario.



**Figura 1.4** Arterias epifisarias ramificadas que se expanden sobre la placa de crecimiento y finalizan justo debajo de la placa (Tomado de Trueta et al 1960).

### **Sistema epifisario.**

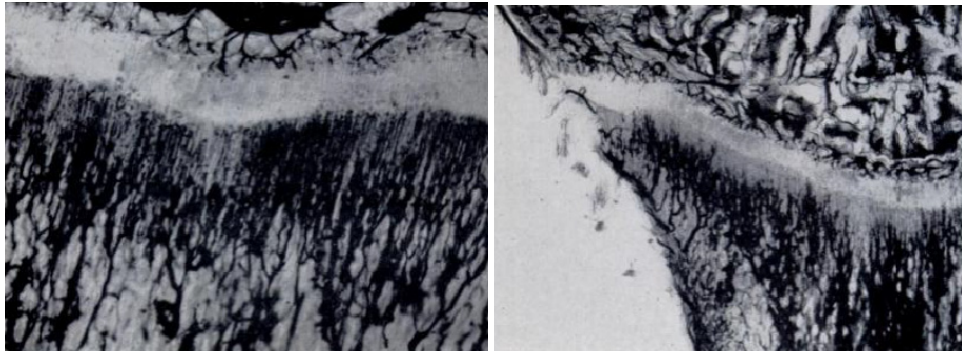
Las arterias epifisarias penetran en la epífisis cerca de la inserción capsular. Las arterias se ramifican hasta alcanzar la zona del germinativo y la zona alta del proliferativo, formando un sistema en forma de rastrillo que irriga la epífisis anastomosándose con el sistema de retorno venoso. Si se interrumpe la vascularización epifisaria (Trueta *et al* 1963) se produce la muerte de todos los condrocitos de la placa (Fig 1.4).

### **Sistema metafisario**

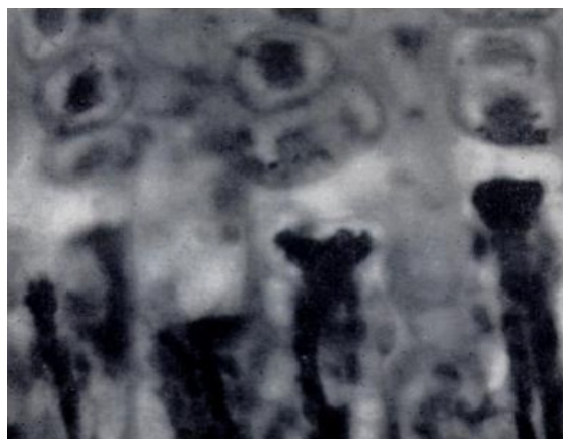
Los vasos metafisarios, tienen su origen en la arteria nutricia. Ésta se ramifica conforme se acerca a la región metafisaria y se distribuye a lo largo de la placa de crecimiento (Fig 1.5). Las regiones periféricas de la placa se nutren a través de las ramificaciones de arterias del periostio. Las ramificaciones se van sucediendo hasta formar un sistema de arteriolas en forma de horquilla (Trueta *et al* 1960) que terminan en un conglomerado de sinusoides y llegan hasta el último septo transversal del cartílago mineralizado para penetrar en las lagunas condrocitarias de la zona hipertrófica, constituyendo la denominada zona de invasión vascular. Es en este punto donde se inicia el retorno venoso que se organiza de forma análoga al sistema arterial (Trueta *et al* 1960, Aharinejad *et al* 1995).

Se trata de una zona donde la circulación se enlentece permitiendo el intercambio de nutrientes. La vascularización metafisaria recuerda a la circulación renal (Trueta *et al* 1947, Trueta *et al* 1960, Trueta *et al* 1960) aunque a diferencia del sistema renal, éstas no se anastomosan entre ellas. Si se

interrumpe la circulación metafisaria (Trueta *et al* 1961, Trueta *et al* 1968) únicamente se observa un fracaso en el reemplazo de cartílago a nivel de la unión condro-ósea y es imprescindible para la señalización de la muerte celular del condrocito terminal para que se deposite la matriz cálcica (Farnum 2006).



**Figura 1.5** a) Ramificaciones de la arteria nutricia que irriga la zona central de la región metafisaria b) Ramificaciones de las arterias del periostio que irrigan la zona periférica de la placa (Tomado de Trueta *et al* 1960).



**Figura 1.6** Sistema de asas arteriales llegando al último septo transverso del cartílago mineralizado. Obsérvese que no existe contacto entre las últimas células hipertróficas y el vaso (Tomado de Trueta *et al* 1960).

Entre los sistemas arteriales epifisario y metafisario se crea un gradiente de oxígeno a lo largo de la placa de crecimiento que permite la nutrición de la placa. La dirección del gradiente de oxígeno y nutrientes es variable dependiendo de la concentración de éstos en cada uno de los sistemas (Farnum *et al* 2006).

#### **Sistema arterial que proviene del anillo fibroso**

Se trata de un sistema formado por una arteria situada a lo largo del surco de Ranvier. Esta arteria rodea la placa por debajo del pericondrio a nivel de la región del hipertrófico y se ramifica conforme avanza en profundidad hasta

llegar a contactar con la capa más externa de células del hipertrófico. Posteriormente se anastomosa con el sistema metafisario creado por la arteria nutricia. Se postula (Farnum *et al* 2006) que este sistema está implicado en la regulación paracrina de la placa y que incluso puede modificar el bucle de señalización Proteína Relacionada con la Hormona Paratiroidea (*Parathyroid Hormone related Protein, PTHrP*)-factor Erizo Indian (*Indian hedgehog, Ihh*), PTHrP-Ihh.

Cajal en 1910 (Cajal 1910) describe un sistema de “fibras permeables” en la placa de crecimiento, según él, presumiblemente responsables de la nutrición de la placa.

#### **1.1.4 Crecimiento de la placa de crecimiento**

La placa de crecimiento es la responsable del crecimiento en longitud y en anchura. Algunos autores sostienen que la célula troncal (*stem cell*) se encuentra en la zona germinativa de la placa de crecimiento (Olsson *et al* 1982, Ring 1955, Abad *et al* 2002). Mientras que otros sugieren que se encuentra en la zona proliferativa (Siffert *et al* 1966).

La proliferación celular se produce en una estrecha banda de células en la región proliferativa. Este proceso puede producir ocho nuevas células en cada columna por día. Estudios histomorfométricos en ratas muestran que una capa de células hipertróficas se elimina de la placa cada tres horas (Ballock *et al* 1993).

#### **Crecimiento en longitud de la placa de crecimiento**

El condrocito de la placa de crecimiento contribuye al crecimiento en longitud mediante una combinación de procesos como son la proliferación, la secreción de matriz extracelular y la hipertrofia. La aportación relativa de cada uno de estos procesos varía en función de la localización anatómica y la edad. Cuanto mayor sea la tasa de crecimiento mayor será la contribución de la hipertrofia celular y menor será la contribución de la síntesis de matriz extracelular (Wilsman *et al* 1996). El crecimiento de la placa en la mayoría de las especies animales es monopolar, desde el proliferativo hacia la metáfisis (Hunziker *et al* 1987).

La placa de crecimiento crece mediante cuatro mecanismos (Hunziker *et al* 1989, Wilsman *et al* 1996, Farnum *et al* 2000): 1) División celular. La tasa de división celular a nivel del proliferativo varía en función de la edad, localización, ritmo circadiano y especie, aporta un 7% a 10% del tamaño; 2) aposición celular, algunos autores sugieren que se produce por células del anillo pericondral; 3) por aumento de la matriz extracelular: mediante la síntesis por parte de los condrocitos de moléculas colágenos, glicoproteínas, etc. En la zona del proliferativo la síntesis de matriz aporta entre un 16% a un 21% del tamaño; en la zona hipertrófica aporta un 44% a un 59% del tamaño, y; 4) aumento del tamaño celular, de forma más notable en la zona hipertrófica (Moss-Salentijn *et al* 1987).

La contribución al crecimiento de la placa de cada uno de los mecanismos fue descrita por Wilsman (Wilsman *et al* 1996). La hipertrofia de los condrocitos aporta entre un 44 y un 59%, la síntesis de matriz extracelular en el hipertrófico entre un 14 y un 28%, la división celular entre un 7 y un 10% y la síntesis de matriz en el proliferativo entre un 16 y un 21%.

### **Crecimiento en anchura de la placa de crecimiento**

Existen diferentes hipótesis por las cuales se produce el crecimiento en anchura de la placa (Moss-Salentijn *et al* 1987, Hert *et al* 1972). La primera, sugerida por Langenskiöld (Langenskiöld *et al* 1988) se basa en el crecimiento intersticial del cartílago en anchura a través de la placa. La segunda, propuesta por Hert (Hert *et al* 1972) se basa en la existencia de una región marginal cercana a la periferia que produce el crecimiento en anchura. La tercera, propuesta por Shapiro (Shapiro *et al* 1977) sugiere un mecanismo aposicional en la zona germinativa marginal por parte de células del anillo pericondral. En nuestro laboratorio se ha observado que la capacidad morfogénica de la región lateral de la placa de crecimiento participa en el crecimiento lateral de la misma (Miralles-Flores y Degado-Baeza 1992).

#### **1.1.5 Función y regulación de la placa de crecimiento**

La función de los condrocitos está controlada por moléculas circulantes tales como las hormonas, así como también sustancias producidas localmente por los mismos condrocitos, o por células del anillo pericondral. La mutación de



los genes que codifican estas moléculas da lugar a condrocitos con comportamientos anormales y displasias del esqueleto (Mackie *et al* 2011). Existen varios ejes o bucles de señalización que regulan la proliferación celular a nivel de la placa de crecimiento:

### **Sistema GH**

La Hormona del Crecimiento (*Growth Hormone*, GH) es un estimulador importante de la proliferación del condrocito, que se produce en la glándula pituitaria. Uno de los estímulos más importantes para la proliferación de los condrocitos de la placa de crecimiento es la hormona de crecimiento (GH). Ésta media sus efectos a través de la estimulación de la síntesis de el factor de crecimiento tipo Insulina 1 (*Insulin-Like Growth Factor 1*, IGF1) tanto en el hígado como en los condrocitos de la placa a nivel de la zona del hipertrófico (Pass *et al* 2009, Oberbauer *et al* 1995). La importancia del eje GH/IGF1 se pone de manifiesto en el crecimiento excesivo que sufren los pacientes con niveles de GH elevados. (Mackie *et al* 2011) Un segundo factor, factor de crecimiento tipo Insulina 2 (*insulin-like growth factor 2*, IGF2), se expresa en la placa de forma independiente a la GH y es imprescindible para el correcto crecimiento en longitud (DeChiara 1991). La GH estimula de forma independiente las células del germinativo de la placa de crecimiento (Ohlsson 1992).

El factor Erizo Indiano (*Indian hedgehog*, Ihh), es producido por condrocitos de transición del proliferativo a la zona hipertrófica, son los condrocitos “pre-hipertróficos”. Ihh se requiere para el normal funcionamiento de los condrocitos en la zona del proliferativo. Ihh ejerce su efecto mediante su unión en la superficie celular al receptor parcheado 1 (*Patched 1*, Ptch1), que normalmente suprime la señal a través de una proteína de la membrana “alisado” (*Smoothed*, Smo), pero la unión de Ihh a Ptch1 produce un efecto reverso inhibitorio y permite que ocurra la señal de la vía Ihh. La respuesta de los condrocitos a Ihh es mediada por miembros de factores de transcripción de la familia Gli. Ihh estimula la producción de condrocitos (Mackie *et al* 2011).

Ihh es el principal regulador de la diferenciación condrocitaria. Es secretada por los condrocitos prehipertróficos y es necesaria para la proliferación de éstos (Maeda 2007). Ihh transmite una señal de retorno a través del pericondrio a las células periarticulares para que incrementen la producción de

PTHrP. Esta recepción de la señal en el pericondrio involucra a los receptores de Ihh, así como el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (*Transforming growth factor- $\beta$* , TGF- $\beta$ ) que actúan incrementando la producción de PTHrP en las células periarticulares y pericondrales así como inhibiendo la hipertrofia de los condrocitos (Serra *et al* 1999).

Ihh media sus efectos a través del receptor de superficie Ptch1. La señalización intracelular se encuentra mediada por miembros de los factores de transcripción de la familia de Gli (Wuelling 2010). Ihh inactiva la forma supresora de Gli3 estimulando la proliferación del condrocito. La proliferación celular en respuesta a Ihh, así como a otros factores, se encuentra también mediada por ciclinas, su forma D1 (ciclina D1) es imprescindible para que se lleve a cabo una proliferación sin alteraciones.

El aumento de la síntesis de PTHrP a nivel de las células periarticulares es detectado por las células del proliferativo que tienen un receptor para PTHrP, el cual ralentiza la producción de células que producen Ihh, controlando de este modo el ritmo de diferenciación hipertrófica (O'Keefe *et al* 1994).

### **Sistema WNT**

WNT (*Wingless proteins*) es una familia de proteínas expresada por los condrocitos de la placa de crecimiento y son capaces de producir su proliferación (Tamamura *et al* 2006). En la literatura aún se discute si su efecto es mediado o no por las beta-cateninas (Mackie *et al* 2011). La activación de la familia de proteínas WNT en el condrocito maduro induce la hipertrofia, la mineralización de la matriz extracelular y la producción de varias metaloproteinasas (MMPs 7,9 y 13) Además interacciona con otras vías de señalización como PTHrP e Ihh, aunque su implicación en cada una de estas vías no está por el momento caracterizada.

### **Sistema BMP**

Las proteínas morfogenéticas del hueso (*Bone Morphogenetic Proteins*, BMPs) son miembros de la súper-familia del factor TGF- $\beta$ , existen 7 subtipos (Wozney 1989). La activación de la señal BMP en la placa de crecimiento resulta en la proliferación de los condrocitos (Mackie *et al* 2011), también favorece la

expresión de *Ihh* induciendo de esta manera la proliferación del condrocito (Grimsrud *et al* 2001).

### **Sistema FGF**

El factor de crecimiento fibroblástico (*Fibroblast Growth Factor*, FGF) presenta 22 formas diferentes que se unen a 4 tipos de receptores para FGF (*Fibroblast Growth Factor Receptor*, FGFR); el más importante en la regulación de la placa del crecimiento es el receptor tipo 3 (FGFR3) que se expresa en los condrocitos hipertróficos. Cuando se produce la activación de FGFR3 se produce una inhibición de la proliferación del condrocito mediante la inhibición de la síntesis de *Ihh* (Kato *et al* 1990). La acondroplasia es la enfermedad más grave que se produce. Parece que la represión inducida por la expresión de FGF en los condrocitos de la zona de proliferación se limita a la retirada del sulfato de los glicosaminoglicanos, alterando la matriz extracelular (Mackie *et al* 2011).

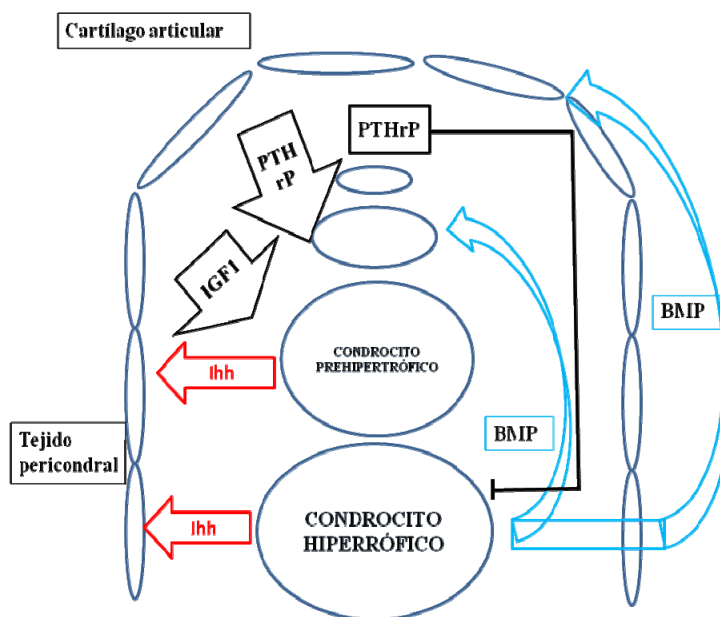
### **Sistema CEBP-Beta/CHOP**

CEBP- $\beta$  (*CCAAT/Enhancer-Binding Protein-Beta*) y su proteína homóloga CHOP (*C/EBP-Homologous Protein*) son dos familias de factores de transcripción que actúan como reguladores de la diferenciación celular. También se ha implicado en la regulación de la placa de crecimiento (Martos-Rodríguez *et al* 2003). La expresión C/EBP, factor de transcripción asociado a la diferenciación celular, predomina sobre la de CHOP en la región entre la zona del germinativo y de la zona superior del proliferativo. En las capas bajas del proliferativo y el hipertrófico predomina la actividad de CHOP, factor de transcripción asociado con la muerte celular. Si este eje se rompe a favor de CHOP, en la placa de crecimiento se producen escasas células en la zona del proliferativo.

### **Sistema PTHrP-Ihh**

El eje de señalización Proteína relacionada con la hormona paratiroidea (*Parathyroid Hormone related Protein*, PTHrP)-factor Erizo Indiano (*Indian hedgehog*, *Ihh*), PTHrP-Ihh regula el momento en que las células de la zona proliferativa de la placa de crecimiento comienzan a hipertrofiarse, este estadio se manifiesta en diferentes cambios del fenotipo celular.

Las células del pericondrio, y de forma particular el anillo pericondral de los huesos largos, producen una proteína llamada proteína relacionada con la hormona paratifoidea (*Parathyroid Hormone Related Protein* (PTHrP). Esta proteína difunde hacia la zona del prehipertrófico donde se encuentran situados en sus células los receptores de PTHrP. PTHrP retrasa la diferenciación de los condrocitos manteniéndolas en un estado quiescente evitando que se conviertan en condrocitos hipertróficos. Conforme se van alejando del prehipertrófico, los condrocitos dejan de estar estimulados por la PTHrP y comienzan a sintetizar Ihh. PTHrP suprime el proceso de hipertrofia, conservando los condrocitos en estado proliferativo. PTHrP ejerce este efecto al menos en parte mediante la inhibición de la expresión del factor de transcripción relacionado con Runt 2 (*Runt-related Transcription Factor 2*, RUNX2); RUNX2 induce la transcripción condrocítica de genes asociados a la hipertrofia incluyendo col10alfa1 y promueve la hipertrofia. La supresión de la hipertrofia por PTHrP es probablemente mediada también por el factor caja relacionada con el factor de alta movilidad Sry-9 (*Sry related HMG box 9*, SOX9) (Mackie *et al* 2011).



**Figura 1.7** Diagrama en el que se muestra la interacción de los distintos ejes sobre la placa de crecimiento.

### Otros factores que influyen sobre la placa de crecimiento

Existen otros factores que regulan el crecimiento y la diferenciación de la placa. Entre ellos se encuentran diferentes factores hormonales como son la

Tiroyodotironina (T3). La T3 promueve el reclutamiento de condrocitos desde la zona de reserva hasta el proliferativo, estimulando la proliferación y diferenciación del condrocito. También regula el sistema Wnt/B-catenina. Los Estrógenos inhiben el crecimiento en longitud de la placa de crecimiento mediante el bloqueo del efecto de la GH. Los Andrógenos estimulan la proliferación del condrocito, aunque si sus niveles son excesivos se produce osificación precoz y por tanto retraso del crecimiento.

Los glucocorticoides inhiben el crecimiento mediante la inhibición de la incorporación de sulfatos a las células de la placa de crecimiento y mediante la inhibición de efecto de las somatomedinas en la placa de crecimiento.

La vitamina D estimula la proliferación de los condrocitos en el hipertrófico y favorece la síntesis de colágeno tipo II (Ballock *et al* 2001). Los glucocorticoides inhiben el crecimiento de la placa y la vascularización y son antagonistas de los efectos de la vitamina D en la placa de crecimiento.

El Factor de crecimiento Vascular Endotelial (*Vascular Endothelial Growth factor*, VEGF) es uno de los factores angiogénicos más potentes. VEGF se expresa en los condrocitos maduros en las zonas más distales del hipertrófico (Gerber *et al* 1999) y estimula la proliferación y migración de células endoteliales en la región más baja del hipertrófico; su expresión se encuentra regulada por el factor inducible de hipoxia 1 (*Hipoxia Inducible Factor-1*, HIF-1).

Las **Metaloproteinasas de matriz (MMPs)** se encargan de la degradación y remodelación del condrocito hipertrófico (D'Angelo *et al* 2001). Las MMPs están formadas por una familia de 20 proteasas. MMP-13 se produce en los condrocitos hipertróficos y es secretada por las vesículas de la matriz. MMP-9 es expresada en los condroclastos y metaboliza los componentes de la matriz. Las MMPs además promueven la angiogénesis en las zonas más proximales del hipertrófico.

En el condrocito se expresan en mayor o menor grado: **IGF** (IGF-1 e IGF-2) es uno de los factores de crecimiento más potentes que afectan al desarrollo esquelético, IGF-2 se produce localmente en el condrocito, y en la rata, a diferencia del humano es más importante que IGF-1 en cuanto a la estimulación, diferenciación, proliferación y mantenimiento del fenotipo condrocitario.

### 1.1.6 Resistencia a la hipoxia de la placa de crecimiento

Dado que la placa de crecimiento es una estructura avascular que se nutre mediante difusión de los tres sistemas arteriales de irrigación la cuestión que se plantea es ¿cómo sobrevive el condrocito a las condiciones de hipoxia que se dan dentro de la placa de crecimiento?

La respuesta a esta pregunta se encuentra en el metabolismo del condrocito. Éste obtiene su energía de la vía glicolítica, se trata de una vía corta que puede generar pequeñas cantidades de Adenosín trifosfato (ATP) a una velocidad suficiente como para satisfacer las demandas energéticas del condrocito (Shapiro *et al* 2007).

Entre los sistemas arteriales que nutren a la placa se crea un gradiente de oxígeno que tiene su punto de concentración más bajo (2-5%) en el hipertrófico. En la zona de unión condro-ósea se dan las mayores concentraciones de oxígeno de la placa, estas condiciones favorecen el metabolismo de osteoblastos y osteoclastos mientras que por el contrario favorecen la muerte del condrocito.

Uno de los aspectos más importantes en la regulación del metabolismo de la placa es cómo se produce la detección de las concentraciones de oxígeno dentro de la placa. Los condrocitos son capaces de detectar la tensión local de oxígeno en las diferentes zonas de la placa mediante la actividad de una familia de proteínas sensor, las prolil-hidroxilasas (PHDs), que median la activación del factor de transcripción de HIF (Terkhorn *et al* 2007, Schipiani *et al* 2001).

HIF posee dos isoformas HIF-1 e HIF-2. Favorece la glicolisis e inhibe la función mitocondrial disminuyendo las necesidades de oxígeno de la célula (inhibe la enzima piruvato deshidrogenasa favoreciendo la glicolisis) (Simon *et al* 2006). Además media la respuesta celular a la hipoxia mediante la regulación de la expresión de genes que controlan la adaptación metabólica, el aporte de oxígeno y la supervivencia celular en condiciones de hipoxia (Shapiro *et al* 2007).

Recientemente se ha identificado el papel de HIF en la regulación del desarrollo óseo, la formación de hueso, además se ha relacionado la sobreexpresión de HIF-2 con el osteosarcoma y la artrosis (Rankin *et al* 2011).

Cuando se produce una disminución de la concentración de oxígeno en el condrocito es detectada por las PHDs que median la estabilización de HIF. HIF media la regulación de enzimas implicadas en la glicolisis y produce la disminución del consumo de oxígeno a nivel mitocondrial (Shapiro *et al* 2007).

A parte del sistema PHD-HIF, existen una serie de proteínas de señal que detectan cambios en el microambiente del condrocito.

#### **1.1.7 Muerte celular**

La mayoría de los condrocitos hipertróficos mueren en la zona próxima a la metáfisis antes de la línea de osificación. Aunque tradicionalmente se ha postulado que la muerte del condrocito se produce por apoptosis (Gibson *et al* 1998, Adams *et al* 2002), existen trabajos que no han conseguido identificar condrocitos apoptóticos (Roach *et al* 2004, Emons *et al* 2009). De hecho, los condrocitos claros parece que se desintegran con su membrana externa íntegra mientras que los condrocitos oscuros expulsan su citoplasma al espacio extracelular.

Algunos condrocitos en estado de diferenciación terminal sufren un proceso denominado autofagia mediante el cual la célula degrada sus organelas, membranas y proteínas. Este proceso se inicia con la formación de una membrana dentro de la célula que secuestra proteínas intracelulares formando un autofagosoma. Posteriormente éste se une a lisosomas formando un autofagolisosoma.

#### **1.1.8 Cierre fisario**

A medida que el esqueleto se aproxima a su madurez, la tasa de crecimiento longitudinal del hueso y la proliferación condrocitaria en la placa disminuyen y la tasa de avance del frente de osificación en mayor medida que la tasa de reemplazo de los condrocitos. En este momento, se puede observar disminución de la altura de la placa debido a la pérdida de altura de las zonas proliferativa e hipertrófica, así como disminución del tamaño de las células hipertróficas y de la densidad columnar. Los centros de osificación primario y secundario se van acercando hasta que se fusionan. En los humanos y en algunos mamíferos la placa se reabsorbe por completo al finalizar la pubertad y

la epífisis se fusiona con la metáfisis. En el humano este proceso es regulado por los estrógenos, que aceleran el proceso de envejecimiento del condrocito hipertrófico (Weise *et al* 2001).

## **1.2 TRASPLANTE DE PLACA DE CRECIMIENTO**

La función de la placa de crecimiento puede verse alterada por diferentes mecanismos como son los traumatismos, tumores, infecciones o malformaciones congénitas. Todos ellos pueden conllevar como secuela deformidad o acortamiento del miembro (Boyer *et al* 2007). Las técnicas utilizadas para corregir o minimizar la deformidad son variadas e incluyen, entre otros, los injertos autógenos o alogénicos de hueso, aloinjertos corticales no vascularizados, injertos óseos vascularizados y la osteogénesis a distracción.

Estas soluciones, aunque utilizadas, no son las idóneas en el esqueleto en crecimiento puesto que no son capaces de compensar todo el potencial de crecimiento de la placa dañada. Por todo esto se ha considerado que el trasplante de placa de crecimiento puede representar una solución a este problema. Sin embargo no se trata de una técnica exenta de problemas.

### **1.2.1 Problemas del trasplante de placa de crecimiento**

En la actualidad, a la hora de estudiar la viabilidad del trasplante de placa de crecimiento hay que tener en cuenta las siguientes consideraciones.

En primer lugar existen problemas técnicos, las técnicas microquirúrgicas para la extracción de la placa del donante e implantación en el receptor no están libres de complicaciones y fracasos. La fijación del trasplante mediante sistemas de osteosíntesis debe realizarse con sistemas que permitan la correcta integración de la placa donante en el lecho del receptor. Por último existen complicaciones derivadas de la intervención como son la infección, fracaso del trasplante o del material de osteosíntesis.

Existe un problema inmunológico muy importante. La placa de crecimiento es un aloinjerto que provoca rechazo en el donante por lo que es necesaria la administración de fármacos inmunosupresores.



Existe también un problema de conservación de la placa. Mientras se realiza el trasplante la placa debe ser conservada en un líquido que conserve la viabilidad de la placa de crecimiento. También es necesario considerar la posibilidad de conservar la placa de crecimiento en frío, crioconservación, para que pueda ser utilizada en otro momento o por el contrario valorar la opción de utilizar cultivos de condrocitos sobre matrices.

Dado que la disponibilidad de donantes es escasa es necesario valorar la posibilidad de realizar trasplantes entre donantes y receptores de distinta edad (trasplante heterocrónico) y trasplante de placa de crecimiento entre regiones corporales diferentes (alotrasplante heterotópico).

### **1.2.2 Evolución histórica del trasplante de placa de crecimiento**

Las primeras aproximaciones experimentales del trasplante de placa de crecimiento aislada fueron realizadas por grupos alemanes a finales del siglo XIX y principios del siglo XX. Helferich, en 1899, realizó el primer trasplante de placa de crecimiento avascular de cúbito distal en un modelo experimental de perro. La mayoría de estos trasplantes fracasaban y el éxito, en términos de crecimiento en longitud, era esporádico (Hass 1915).

El primer trasplante epifisario realizado en humanos fue realizado por Straub en 1929 (Pho *et al* 1988). Straub realizó un trasplante de epífisis tibial a la pierna contralateral en un paciente con secuelas de infección en la tibia proximal con cierto grado de crecimiento del trasplante. En 1954 Graham (Graham *et al* 1954) comunicó el caso de un trasplante autólogo de una articulación metatarsofalángica a la articulación metacarpofalángica del primer dedo en un niño de 3 años de edad. La evolución del trasplante fue satisfactoria de modo que la epífisis continuó creciendo, 5mm en 26 meses. Graham atribuyó el éxito del trasplante a que el tamaño del hueso trasplantado era pequeño y esto permitiría la restauración del aporte vascular a la placa de crecimiento.

Lacroix (Lacroix *et al* 1951) realizó un trasplante en un modelo animal de placa de crecimiento en la cápsula renal de un receptor heterólogo. Durante las primeras semanas observó un crecimiento óseo que se fue ralentizando progresivamente y sugiere el papel que puede desempeñar la inmunidad en este tipo de trasplantes. Posteriormente Urist y McLean (Urist *et al* 1952) realizaron

un trasplante de placa de crecimiento a la cámara anterior del ojo del conejo. En las fases precoces del trasplante se observó crecimiento óseo pero después de 7 semanas no había evidencia de la proliferación de células cartilaginosas.

Tanto Ring (Ring 1955) como Harris (Harris *et al* 1965) utilizaron un modelo experimental de trasplante de placa de crecimiento de fisis distal de cúbito de conejo (Fig 1.8). En ambos casos se trataba de un trasplante de placa de crecimiento aislada.

En todos estos experimentos el fracaso del trasplante era la norma. Este fracaso se atribuía a diferentes causas como son el rechazo del trasplante al no disponer de agentes inmunosupresores y errores técnicos. Para el éxito del trasplante son necesarias la unión ósea a nivel metafisario del hueso receptor y la vascularización del lado epifisario (Ring *et al* 1955).

En 1966 Eades (Eades *et al* 1965) comunicó el caso de un trasplante, realizado en 1953, de articulación interfalángica proximal con epífisis en una paciente de 5 años de edad. Posteriormente se han comunicado varios casos de trasplante epifisario principalmente de dedos (Whitesides *et al* 1977, Rank *et al* 1978).



**Figura 1.8** Ejemplos de trasplante de placa de cúbito distal a) Trasplante de placa de cúbito distal (Ring *et al* 1955) b) Trasplante de placa de cúbito distal (tomado de Harris *et al* 1965).

Durante la década de los 60 se realizaron importantes aportaciones al conocimiento de la vascularización de la placa de crecimiento (Trueta *et al* 1960), este hecho sumado al desarrollo de las técnicas de microcirugía permitieron el desarrollo del trasplante vascularizado de placa de crecimiento. En

1975 Taylor (Taylor *et al* 1975) realizó el primer trasplante vascularizado de peroné para una reconstrucción de la tibia contralateral. En 1978 Pho (Pho *et al* 1979) realizó el primer trasplante vascularizado de peroné con fisis para la reconstrucción del radio distal. Donsky (Donsky *et al* 1980) realizó estudios de trasplante vascularizado de placa de crecimiento en cúbito distal en perros y observó que las placas que se habían revascularizado presentaban crecimiento longitudinal mientras que en el caso de las placas no vascularizadas se producía un cese del crecimiento. Tomita (Tomita *et al* 1986) estudió el papel de las circulaciones metafisaria y epifisaria en el trasplante de placa de crecimiento en un modelo experimental de perro y observó la necesidad de la revascularización metafisaria y epifisaria para la viabilidad del trasplante.

Desde el punto de vista de la vascularización existen dos hipótesis de trabajo. Unos defienden la necesidad de revascularización de la placa como evento imprescindible de cara a la viabilidad de la placa trasplantada (Takato *et al* 1993). Mientras que otros autores se inclinan por una auto-revascularización de la placa como método alternativo (Bray *et al* 2002).

Se desconoce de qué manera los injertos avasculares de placa de crecimiento se revascularizan y conservan su potencial de crecimiento. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se ha estudiado la viabilidad de los injertos avasculares de placa de crecimiento (Fuster 2004). Esta viabilidad se cree que es debida a la resistencia a la isquemia de las células de la placa de crecimiento (Shapiro *et al* 2007) y al pequeño tamaño de la placa trasplantada.

Durante la década de los 80 se realizaron importantes avances en el trasplante de placa de crecimiento. Se avanzó en el estudio de la viabilidad del trasplante ortotópico de la placa de crecimiento (Bowen *et al* 1894, Bowen *et al* 1988). También se realizaron estudios de la viabilidad de la placa tras diferentes tiempos de isquemia (Stark *et al* 1987) donde se constató que tiempos de isquemia superiores a las tres horas producían daños irreversibles en la placa de crecimiento.

Posteriormente se realizaron experimentos de trasplante de placa de crecimiento heterotópico en el mismo receptor (Ford *et al* 1987, Boyer *et al* 1993) y se abordó el problema de la inmunosupresión al realizar alotrasplantes en un modelo animal de conejo al que se realizaba un alotrasplante vascularizado de tibia proximal con inmunosupresión con Ciclosporina A. La

placa de crecimiento trasplantada era viable y continuaba creciendo durante el tiempo de seguimiento.

La realización de alotrasplantes representaba una opción atractiva debido a que eliminaría la morbilidad de la zona donante. Sin embargo en los primeros estudios (Boyer *et al* 1993) la inmunosupresión debía ser mantenida durante toda la vida del modelo experimental por lo que se consideró una opción no viable para su uso en humanos.

Dado que el trasplante de placa se realizaría en el contexto de patologías que en teoría no amenazan la vida del paciente, el mantenimiento a largo plazo de la terapia inmunosupresora es, cuanto menos, controvertido. Diferentes estudios (Bray *et al* 2004) han considerado, de forma experimental, la posibilidad de administrar pautas cortas de inmunosupresión en el contexto del trasplante de placa de crecimiento con resultados aceptables en cuanto a su viabilidad. Esta teoría se basa en la hipótesis de que la actividad osteoclástica eliminaría las células donantes que desencadenan la actividad inmunógena no obstante aún no se ha determinado la cronología exacta de este evento. En los experimentos realizados por Bray se empleó con éxito una pauta de inmunosupresión corta, 6 semanas tras el trasplante fisario (Bray *et al* 2004). Este grupo demostró que tras un trasplante heterotópico vascularizado de placa de crecimiento en cresta ilíaca, 6 semanas de inmunosupresión eran suficientes para evitar el rechazo agudo del injerto. En nuestro laboratorio se han realizado estudios que constatan la viabilidad del trasplante fisario en ausencia de inmunosupresión (Escario 2008).

La teórica disponibilidad de donantes de placa de crecimiento es escasa por lo que existen varios problemas aún no resueltos. El primer problema es la correspondencia entre zona donante y receptora. El segundo es la discrepancia entre la edad de donante y el receptor.

Para solucionar el problema de la discrepancia entre la correspondencia entre la zona donante y la receptora (alotrasplante heterotópico) se realizó (Glickman *et al* 2000) un experimento en conejos en el que se realizaba un trasplante de placa de crecimiento del segundo metatarsiano a sitios con diferentes tasas de crecimiento, segundo metacarpiano y tibia proximal. Sus resultados demostraron que la tasa de crecimiento de la placa trasplantada depende del lugar donante y no del lugar donde es implantada.

Una de las aproximaciones experimentales al problema de la correspondencia entre la zona donante y receptora (alotrasplante heterocrónico) fue planteada por Stevenson (Stevenson *et al* 1993) quien realizó un experimento en un modelo animal de conejo en el que trasplantaba epífisis tibiales vascularizadas entre animales de diferente edad. Sus resultados mostraban que la tasa de crecimiento del trasplante dependía de la edad de la placa trasplantada y no de la edad del receptor.

Estos hechos tienen importantes implicaciones clínicas ya que a la hora de realizar un trasplante en una situación clínica real podría ser muy difícil encontrar una placa donante de la misma edad y características del receptor, por lo que es esencial tener en cuenta que el potencial residual de crecimiento depende de la edad y el tipo de placa del donante, no del receptor.

Las técnicas de cirugía microvascular han permitido la realización de autotrasplantes vascularizados de la placa de crecimiento con resultados clínicos aceptables en cuanto a viabilidad y crecimiento. La mayoría de los trasplantes de placa de crecimiento realizados en humanos son casos aislados y existen, en la actualidad, pocas series publicadas (Innocenti *et al* 2002). Uno de los problemas de estos autotrasplantes es la morbilidad de la zona donante. Existen dos tipos de trasplante de placa de crecimiento vascularizada, trasplantes de apófisis como son los trasplantes de cresta ilíaca, escápula y trasplantes de dedo de pie a mano. El otro grupo son los trasplantes de peroné proximal vascularizado.

La cresta ilíaca no posee una verdadera epífisis, sino una apófisis. Mayr (Mayr *et al* 2000) realizó un trasplante de cresta ilíaca a maleolo medial para reconstruir un defecto. El trasplante de la cresta de la escápula presenta la ventaja de que se puede utilizar para reconstruir defectos en el húmero proximal utilizándolo como un colgajo en isla. El trasplante de dedo de pie a mano se utiliza para la reconstrucción de deformidades congénitas de la mano y para la reconstrucción de defectos postraumáticos (Tonkin *et al* 2005). Este trasplante se puede realizar tanto vascularizado como no vascularizado, teniendo en cuenta que el trasplante vascularizado tiene una tasa de crecimiento mayor que el trasplante no vascularizado (Boyer *et al* 1994).

El peroné proximal es una región no imprescindible para la estabilidad del miembro inferior, esta cualidad ha sido aprovechada para ser utilizada como zona donante (Ihara *et al* 1999). El trasplante de peroné vascularizado se

emplea para la reconstrucción del radio distal y sus resultados a largo plazo en la reconstrucción de defectos tras resección de tumores son buenos (Innocenti *et al* 2006).

### **1.2.3 Aspectos inmunológicos del trasplante de placa de crecimiento y de los alotrasplantes de hueso**

La respuesta inmune del huésped frente al injerto es uno de los problemas más importantes en el trasplante óseo, puesto que de ella va a depender, en gran medida, la incorporación del injerto y su posterior supervivencia.

El hueso, a diferencia de otros órganos sólidos como el riñón o el hígado, se encuentra en un continuo estado de remodelación y sustitución celular. El hueso tiene una capacidad inmunógena propia debido a su capacidad para expresar antígenos HLA (*Human Leucocyte Antigen*).

En el momento del trasplante se produce una gran respuesta inflamatoria local que estimula la proliferación macrófaga. Los macrófagos secretan citoquinas como Interleukina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral alfa (*Tumoral Necrosis Factor- $\alpha$*  TNF- $\alpha$ ) o linfotóxica. Se produce una respuesta celular específica mediada por linfocitos T antígeno específicos frente a los antígenos HLA de clase I. Existe, de manera simultánea, una reacción vascular frente al injerto que produce un engrosamiento de la íntima que puede ocluir la luz del vaso.

El injerto desarrolla una respuesta defensiva frente al huésped a las 2 semanas del trasplante que permanece hasta la semana 14. La respuesta inmune va disminuyendo con el tiempo alcanzándose un equilibrio entre la formación de antígenos y anticuerpos. La médula ósea es la parte más inmunógena del hueso, su reabsorción por parte del huésped es progresiva y permite la atenuación de la respuesta inmune con el paso del tiempo.

En teoría, las células del cartílago fisario se encuentran aisladas de la reacción inmune gracias a la matriz cartilaginosa. Sin embargo, se ha visto que los trasplantes de placa de crecimiento en los que no se realiza inmunosupresión conducen normalmente al fracaso, por lo que parece imprescindible la utilización de inmunosupresión del receptor.

Los fármacos tradicionalmente utilizados en la inmunosupresión han sido la ciclosporina y los corticoides. En la actualidad se han desarrollado numerosos fármacos que se utilizan para evitar el rechazo. Se pueden clasificar en cuatro grandes grupos:

- Inhibidores de los linfocitos T: Ciclosporina, Tacrolimus y Sirolimus.
- Antimetabolitos: Metotrexate, Azatioprina, Mofetil micofenolato. Leflunomida.
- Agentes alquilantes; Ciclofosfamida.
- Terapias biológicas:
  - Agentes frente a citocinas:
    - Anticuerpos monoclonales frente al TNF: Infliximab, adalimumab.
    - Agentes solubles del TNF Etanercept, Lenercept.
    - Agentes frente a al receptor de IL-2: Daclizumab.
  - Agentes frente a linfocitos: Alemtuzumab, Rituximab.
  - Otros tratamientos: Interferón, inmunoglobulinas.

De todos los fármacos descritos, el más utilizado en los modelos experimentales de trasplante de placa de crecimiento ha sido la Ciclosporina A y el Tacrolimus. La Ciclosporina A inhibe la IL-2 y la proliferación linfocitaria. Se administra a dosis de 3-5 mg/kg/día. Sus efectos adversos más frecuentes son la nefrotoxicidad, hirsutismo, hipertensión arterial e hiperplasia gingival.

El Tacrolimus inhibe la activación de los linfocitos T, inhibe la calcineurina y la generación de células-T (*Killer*): Se administra a dosis de 0,1-0,15 mg/kg/día. Sus principales efectos secundarios son la cefalea, vértigo, alteraciones gastrointestinales y la nefrotoxicidad.

El alotrasplante óseo vascularizado es una opción atractiva para resolver los problemas del crecimiento en longitud de diversas patologías que afectan a la placa de crecimiento (Boyer *et al* 2007), dado que se eliminaría la morbilidad de la zona donante que implica el autoinjerto. El principal problema radica en la inmunosupresión necesaria para evitar el rechazo del injerto. Experimentos realizados en alotrasplante vascularizado de epífisis tibial proximal de conejos en los que se realizaba una inmunosupresión farmacológica con ciclosporina A (Boyer *et al* 1995) de por vida demostró que la tasa de crecimiento del trasplante era similar a la de la extremidad contralateral. Sin embargo, esto no resuelve del todo el problema de la inmunosupresión. No hay que olvidar que el trasplante de placa de crecimiento se realiza para solucionar problemas que no amenazan la vida del paciente, excepto en el caso de los tumores. Si la inmunosupresión ha de ser mantenida de por vida, cabe preguntarse si compensa asumir los riesgos de una inmunosupresión permanente.

Para intentar resolver esta pregunta (Bray *et al* 2004), como se ha comentado en el apartado anterior, se comprobó la viabilidad del trasplante de placa de crecimiento vascularizado con pautas cortas de inmunosupresión. Estos hechos sugieren que un alotrasplante vascularizado podría ser viable con el empleo de pautas de inmunosupresión cortas, sin embargo, aún no existe ningún caso realizado en humanos.

#### **1.2.4 Conservación de la placa de crecimiento**

A la hora de realizar un trasplante de placa de crecimiento es necesario conservar la placa desde que se extrae hasta que se implanta en el receptor. Para ello es obligatorio mantener la placa en un medio que permita su conservación durante el tiempo de isquemia. Puede que la placa de crecimiento extraída se implante en un período corto de tiempo, menos de 3 horas, en este caso la placa de crecimiento resiste la isquemia (Stark *et al* 1987). Sin embargo, dado que la teórica disponibilidad de donantes es escasa, en muchos casos no sería posible realizar un trasplante en los momentos inmediatamente posteriores a la extracción. Por ello es necesario buscar sistemas que permitan conservar la placa de crecimiento. Existen dos posibles soluciones al problema. La primera sería la conservación en frío de la placa de crecimiento (crioconservación) y la segunda sería conservar la placa en un medio que permita su supervivencia.



### **Crioconservación**

Con el objetivo de valorar la posibilidad de disponer de tejido viable en ausencia de donante cadáver se ha estudiado la posibilidad de preservar la placa de crecimiento en frío.

Tradicionalmente se han utilizado pautas de congelación para reducir la antigenicidad del hueso (Wingenfeld *et al* 2002). La congelación actúa como un inmunomodulador y conforme aumenta la velocidad de congelación aumenta la tasa de inactivación leucocitaria mientras que el tejido trasplantado permanece intacto. No obstante la congelación disminuye el número de células viables en el tejido trasplantado, de modo que desvitaliza el trasplante. (Egli *et al* 2003) El trasplante de injertos congelados se asocia con complicaciones locales como infección, fracturas por fatiga retardo en la unión con el hueso receptor y pseudoartrosis.

Con el fin de paliar los efectos deletéreos de la conservación en frío se han desarrollado sustancias crioprotectoras como es el Dimetil-sulfóxido (DMSO) (Fuster 2004). El DMSO impide la formación de cristales intracelulares al disminuir el potencial de membrana celular. Los tejidos criopreservados con DMSO parecen poseer un mayor potencial angiogénico y una tolerancia inmunológica aumentada respecto a tejidos con conservados con esta sustancia (Ravindran *et al* 2011).

Por todo esto sería viable el estudio la creación de un banco de placas de crecimiento que permitiría disponer de tejido viable en ausencia de donante en el momento del trasplante.

### **Líquidos de conservación de la placa de crecimiento**

Desde el momento de la extracción de la placa de crecimiento se inicia un periodo de isquemia de la placa extraída que debe tener la menor duración posible (Stark *et al* 1987). Durante la isquemia se produce una disminución progresiva del pH, edema de las células endoteliales y liberación de radicales libres. Conforme avanza el tiempo de isquemia el daño celular es irreversible y se produce la muerte tisular. Para evitar el daño celular existen una

serie de líquidos conservantes que han sido empleados en los estudios de trasplante de placa de crecimiento.

La solución Euro-Collins (E-C) fue utilizada por primera vez como líquido conservante en el trasplante renal. Para intentar igualar las concentraciones de iones tanto en el interior como el exterior de la célula, la solución E-C Presenta una elevada concentración de  $K^+$  y baja en  $Na^+$ , y de ese modo evitar la salida pasiva de iones que se produce en el período de isquemia (Egli *et al* 2003).

La solución Universidad de Winsconsin es similar a la E-C con la diferencia de que contiene azúcares de alto peso molecular, adenosina para favorecer la síntesis de nucleótidos, alopurinol como inhibidor de la xantín-oxidasa y glutatión como sustancia reductora. La solución Universidad de Winsconsin es más utilizada en el trasplante óseo (Egli *et al* 2003).

### **1.3 CÉLULAS TRONCALES O CÉLULAS MADRE Y OSTEOPROGENITORES**

Las células que se dividen con regularidad son indiferenciadas (células madre, *stem cells*). Las células con diferenciación terminal ya no se dividen. Las células madre producen células hijas, las cuales se convierten en nuevas células madre o se diferencian.

Las células madre se distinguen de las células diferenciadas por un modelo de expresión génica diferente en la cual una gran cantidad de factores (hormonas, factores matriciales, entre muchos otros) pueden interaccionar con el programa de expresión génica correspondiente específico de cada célula.

Se distinguen dos tipos de células madre: células madre embrionarias, se conocen como células madre totipotenciales. Se localizan en la zona del embrioblasto del blastocito. En el adulto se encuentra en el tejido hematopoyético. Células madre del adulto, estas células reemplazan uno o dos tipos celulares que caracterizan la estructura hística diferenciada en la cual se encuentran (Sobotta *et al* 2009).

Las tres características de la célula madre son: auto-renovación, por la capacidad de hacer copias de sí mismo; multipotencia, por la capacidad de generar múltiples células hijas; y reconstrucción, por la capacidad de regenerar

el sistema orgánico en la cual reside. Estas tres características la diferencia de otros tipos de células proliferativas.

La médula ósea contiene células que pueden dar lugar a un amplio espectro de estirpes celulares que son capaces de formar tejido conectivo diferenciado, estas células se han denominado células troncales o mesenquimales del adulto. (Caplan *et al* 2007), también se han denominado “células estromales mesenquimales multipotenciales” (Dominici *et al* 2006), dada la confusión que genera el término células madre (Jones *et al* 2011).

Se trata de células sin diferenciación conocida, se considera que se encuentran en un estado quiescente pero son capaces de renovarse mediante división asimétrica. La división asimétrica produce una célula troncal idéntica y una célula progenitora que dará lugar a una línea celular específica (Aggarwal *et al* 2005).

Las células troncales son células pluripotenciales con capacidad para diferenciarse en varios tipos celulares. Se encuentran presentes a lo largo de la vida en prácticamente todos los tejidos aunque su número total disminuye con la edad. Presentan una serie de marcadores celulares de superficie específicos como son el SH 2,3 y 4. (Caplan *et al* 2009). Sin embargo en la actualidad se carece de marcadores específicos de células mesenquimales que se encuentren presentes durante el desarrollo celular y durante la regeneración tisular (Jones *et al* 2011).

Estos progenitores se encuentran en todas las localizaciones del cuerpo humano y han sido aisladas en la médula ósea, grasa, músculo, tejido sinovial, dermis, tejido cerebral, hígado, tendón, etc. Dependiendo de los estímulos que reciban, las células troncales pueden diferenciarse hacia un tipo u otro de tejido.

La regeneración del hueso se encuentra mediada por “osteoprogenitores” y sus ancestros, las células mesenquimales (MSCs). Los osteoprogenitores, también denominados unidades formadoras de colonias tienen menor capacidad de proliferación y una diferenciación limitada. Existen unidades formadoras de progenitores osteogénicos y adipogénicos, aunque no existen, en la actualidad, marcadores específicos que nos permitan distinguir estos progenitores (Jones *et al* 2011).

Se han propuesto diferentes marcadores como son CD 271, CD 146, Stro-1, etc. La dificultad en identificar a los osteoprogenitores se cree que es debida a que tanto éstos como las células mesenquimales se encuentran “escondidos” entre las células estromales que se encuentran en las superficies óseas. Estas células estromales reticulares se consideran pericitos. En la actualidad se cree que las células mesenquimales se encuentran repartidas en muchos tejidos a nivel perivascular formando una pequeña fracción de los pericitos. Esta teoría podría explicar la abundancia de células troncales.

### **Cultivo de células troncales mesenquimales**

Las células troncales mesenquimales expandidas en cultivos han demostrado, en modelos animales (Marcacci *et al* 2007, Quarto *et al* 2001) su potencial para reparar defectos óseos. Sin embargo la traslación a la clínica humana no ha tenido tanto éxito. Para conseguir la reparación de defectos óseos se necesitan grandes cantidades de células mesenquimales. Sin embargo, se sabe que estas células pierden su potencialidad de forma gradual e interrumpen su crecimiento conforme se cultivan (Wagner *et al* 2008).

### **Acciones indirectas de las células mesenquimales pluripotenciales**

Aunque la función principal de las células mesenquimales es formar osteoprogenitores y osteoblastos, estudios recientes (Caplan *et al* 2006) han sugerido que estas células tiene una acción adicional mediante la producción de factores tróficos con efectos paracrinos. Entre estos efectos paracrinos se encuentran los efectos antiapoptóticos, efecto inmunoregulador. El mecanismo molecular por el cual se producen estos efectos paracrinos es desconocido, aunque se sugiere que las células mesenquimales implantadas actuarían como centros de señalización que regularían la respuesta a la lesión (Jones *et al* 2011).

## **1.4 MODELOS EXPERIMENTALES EN PATOLOGÍA OSTEOARTICULAR**

### **Modelos experimentales**

Se define el término modelo animal de laboratorio como “animal en el cual la biología y el comportamiento pueden ser estudiados, o bien procesos

patológicos espontáneos o inducidos pueden ser investigados o bien el proceso, en uno o más aspectos, se parece al mismo proceso observado en humanos u otras especies animales” (Comité Nacional de Investigación de los Estados Unidos sobre modelos experimentales para investigar el conocimiento).

Los modelos animales se pueden clasificar en cinco grupos. (Zúñiga *et al* 2011).

**Modelos inducidos.** Los modelos inducidos utilizan animales sanos en los cuales las condiciones que han de ser investigadas se inducen de forma experimental, mediante métodos quirúrgicos, administración de dietas modificadas, administración de fármacos, cambios etológicos. Muchos de los modelos utilizados para el estudio del trasplante de la placa de crecimiento son modelos inducidos.

**Modelos generados por manipulación genética.** Estos modelos permiten, mediante la generación de animales transgénicos y el noqueo de genes (*knock-out*), el estudio de enfermedades. Gracias al desarrollo de estos modelos se ha podido desarrollar el estudio de la biología de la placa de crecimiento.

**Modelos animales espontáneos.** Se trata de modelos de enfermedad humana que se generan de forma natural como consecuencia de variaciones genéticas (mutaciones). En este modelo animal, la variable a investigar aparece de forma espontánea a partir de la variabilidad genética expresada en una determinada línea animal.

**Modelos animales negativos.** Son aquellas especies, cepas o razas de animales en las cuales una cierta enfermedad no se desarrolla.

**Modelos animales huérfanos.** Este término se utiliza para describir un desorden funcional que ocurre de manera natural en especies no humanas y que aún no ha sido descrito en la especie humana.

Para elegir el modelo animal más adecuado a la finalidad experimental perseguida se deben utilizar una serie de criterios. (Svedsen *et al* 1994):

1. ¿El problema es digno de investigar?
2. Sí,... ¿Puede ser resuelto realmente de alguna forma?
3. Sí,... ¿Puede desarrollarse en un modelo humano?

4. No,... ¿existe algún modelo animal apropiado?

5. Sí,...

¿Es apropiada la especie elegida para resolver el problema?

¿Existe algún estudio previo sin éxito, que demuestre que el modelo elegido es inadecuado?

¿Pueden ser controladas las variaciones genéticas o ambientales?

¿Se puede controlar el estado sanitario del modelo durante todo el estudio?

6. La decisión de elección a favor del modelo, ¿se basa sólo en argumentos científicos o se ha considerado la capacidad del personal e instalaciones, cuestiones económicas o aspectos logísticos?

7. ¿Son las concentraciones y rutas metabólicas de la sustancia probada comparable en modelo, frente al hombre?...Sí

### **ELECCIÓN CORRECTA**

#### **Extrapolación desde los animales al hombre**

El término extrapolación a menudo es usado para poder describir cómo los datos obtenidos de estudios con animales pueden ser aplicados en humanos. La extrapolación se realiza de dos formas; *extrapolación cualitativa*, cuando un modelo animal presenta reacciones a estímulos que se reproducen en otras especies animales y en la especie humana y *extrapolación cuantitativa*, cuando un modelo animal permite discriminar los efectos de diferentes dosis de un determinado producto, y después, estas dosis son aplicables o tienen efectos idénticos en otras especies animales o en la especie humana.

No siempre es posible extrapolar los resultados obtenidos a la especie humana. Por ello es necesario seguir el *principio de extrapolación animal*, en el cual prevalece la homología y semejanza evolutiva entre las estructuras morfológicas y los procesos fisiológicos entre las diferentes especies animales y entre los animales y los humanos.

El trasplante de placa de crecimiento vascularizado se encuentra lejos de ser una técnica exenta de problemas (Boyer *et al* 2007). Así, la disponibilidad de donantes cadáver, las pautas inmunosupresoras y la viabilidad del trasplante a largo plazo y el estudio de la vascularización son cuestiones que deben ser estudiadas para que se convierta en una opción quirúrgica real.

El trasplante avascular de la placa de crecimiento es una opción no viable en clínica humana a día de hoy. En el estudio realizado por Ring (Ring *et al* 1955) se comprobó la inviabilidad del trasplante homólogo, no obstante se han encontrado resultados sugestivos que hacen pensar que se trata de un trasplante viable (Escario 2008).

Es necesario, por tanto, realizar estudios en modelos experimentales que intenten plantear soluciones a estos problemas.

## 1.5 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Tras la síntesis de los conocimientos vigentes, tanto referentes a la morfología y función de la placa de crecimiento, como a los problemas sobre el trasplante de placa de crecimiento, nos encontramos con los siguientes problemas:

¿Cuál es la edad idónea para extraer de un donante la placa de crecimiento? ¿Es apropiado una edad post-natal si la placa aún no está bien definida? ¿Existe variación con el sexo? ¿Los trasplantes deben de ser ortotópicos?

**Conservación temporal de la placa de crecimiento.** En la actualidad se usan dos tipos de medios en los cuales se podría conservar la placa de crecimiento, durante un corto periodo de tiempo antes de su incorporación al donante, aunque no están contrastados. En la actualidad se estudian el medio de Wisconsin y el medio Collins. ¿Son los medios más idóneos, existe posibilidad de usar otro medio? Se carecen de trabajos sobre la viabilidad de la placa en estos medios. Los medios de cultivo de placa de crecimiento ¿cuánto margen de tiempo de viabilidad dan a la placa de crecimiento? ¿Mejoraría el

cultivo de la placa de crecimiento, en medios específicos, sus condiciones de viabilidad antes del trasplante? ¿Se debe trasplantar con o sin anillo pericondral?

**Banco de conservación de placas de crecimiento.** En la actualidad se carece de bancos de placas de crecimiento. ¿Es la crioconservación una posibilidad? ¿Se ha evaluado el tiempo idóneo de crioconservación? ¿Se pueden usar técnicas semejantes a la liofilización, como enfriamiento y desecación? ¿La capacidad de sobrevivir en hipoxia del cartílago de la placa se puede aprovechar en la técnica de trasplante de placa de crecimiento? La técnica de cultivo de la placa en un medio específico, ¿mejoraría las condiciones del trasplante?

**Trasplante combinado de placa de crecimiento y hueso.** ¿Qué han aportado los trasplantes de placas realizados hasta la actualidad? Al igual que se realizan trasplantes osteo-condrales articulares. ¿Es posible realizar trasplantes combinados de placa de crecimiento y hueso? ¿En qué medida se puede respetar un fragmento de epífisis o de metáfisis junto a la placa de crecimiento trasplantada? ¿Qué ventajas tiene, en el trasplante combinado de hueso y placa de crecimiento, mantener una zona libre en ambos márgenes? Trasplantar placa de crecimiento con hueso, ambos unidos. ¿Hasta qué cantidad de hueso se puede mantener en cada margen de la placa?

**Técnicas quirúrgicas.** ¿De qué modo se puede estabilizar la placa de crecimiento en un trasplante, si se supone que debe permitir crecer al hueso? ¿Cuál es el medio técnico idóneo de fijación externa de la extremidad? ¿Debieran incluirse las articulaciones proximales en la inmovilización externa?

**Inmunosupresión.** ¿Cuál es la técnica idónea de inmunosupresión? ¿Cuáles son las dosis y vías de administración idóneas?

**Tratamiento con células MSC.** ¿Qué aporta el tratamiento con células MSC? ¿Se pueden usar las mismas células para dos tejidos diferentes, como son cartílago y hueso? ¿Se conocen y se pueden usar técnicas de movilización de células MSC nativas?

**Tratamientos con factores de crecimiento celular.** ¿Cuáles son los factores de crecimiento idóneos para estimular la placa de crecimiento?



**Modelos experimentales para el estudio de trasplantes de placa de crecimiento.** ¿Es suficiente el modelo actual de trasplantes ortotópicos o heterotópicos de placa de crecimiento? ¿Se puede plantear un modelo de trasplante combinado de placa de crecimiento y hueso?

## **2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## 2.1 HIPÓTESIS

Para el planteamiento de la hipótesis partimos de cuatro asertos conocidos.

La placa de crecimiento, como todo cartílago es capaz de nutrirse en un fluido fisiológico (Seol *et al* 2009; Falchuk *et al* 1970), en un medio de cultivo (Delgado-Martos 2010), e incluso en un baño de fluido tisular del lecho próximo a la placa (Harris *et al* 1965).

La placa de crecimiento enclaustrada en un medio hipóxico puede generar el suficiente ATP procedente de la glicolisis para mantener las bombas de las membranas y secretar complejos de matriz orgánica (Anderson *et al* 2010). Esta glicolisis se produce mediante un metabolismo anaeróbico de la glucosa (Nettles *et al* 2009). Y, como la placa de crecimiento es un cartílago, aún en condiciones de hipoxia es capaz de mantener una homeostasis (Seol *et al* 2009), durante un tiempo aún desconocido.

En contraposición al sistema circulatorio cerrado de los vertebrados y algunos invertebrados, en los que un líquido circula por unos vasos, movidos por una bomba, el corazón. En algunos invertebrados la circulación es de tipo abierto. El corazón bombea sangre a los tejidos en vasos cerrados, pero después la sangre se pone en libertad y vuelve al corazón rezumando por los tejidos sin cursar por vasos (Rommer *et al* 1981). Lo que implicaría que existen sistemas abiertos de nutrición.

Por las aportaciones recientes (Farnun *et al* 2006) que describen la presencia de un plexo vascular en la placa de crecimiento, y, sobre el trabajo de estos autores, una nueva interpretación del trabajo de Cajal (Cajal 1910), se puede sugerir que la placa de crecimiento es capaz de nutrirse en un medio líquido fisiológico.

### **Hipótesis**

Sobre la base de los asertos previos, se plantea las siguientes hipótesis

1º ¿Qué viabilidad tiene el alotrasplante de placa de crecimiento en fresco, o criopreservado, avascular, ortotópico, encastrado en su lecho, tratado o no con células mesenquimales estromales?

2ª En un medio líquido hipóxico fisiológico, sero-hemático ¿Qué viabilidad tiene el alotrasplante de placa de crecimiento en fresco, avascular, ortotópico, combinado con un alotrasplante de hueso? y ¿En qué condiciones quirúrgicas habría que realizar este trasplante combinado?

## **2.2 OBJETIVOS**

Para responder a las preguntas realizadas en la hipótesis se proponen los siguientes objetivos, en un modelo experimental en rata.

Realizar alotrasplante, de placa de placa de crecimiento con o sin hueso, en un medio serohemático inicial en el lecho del donante, y mediante el estudio histológico:

1º Analizar la viabilidad del alotrasplante de la placa de crecimiento simple, crioconservado o en fresco, tratado con célula MSC.

2º Analizar la viabilidad del alotrasplante combinado de placa de crecimiento y hueso. En el trasplante combinado se incluyen dos posibilidades: placa de crecimiento y hueso unidos; y, placa de crecimiento y hueso separados.

### **3 PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO**

Diseño del estudio. Para el estudio de los objetivos propuestos en el presente trabajo, se propone el siguiente diseño de estudio.

Análisis bibliográfico de los distintos problemas que implican el tema propuesto y síntesis de los mismos. El análisis, final, conduce a una justificación del tema a tratar.

De la justificación del tema a tratar se extraen las hipótesis que se consideran oportunas. Para responder a las hipótesis propuestas, se plantean unos objetivos relacionados con ellas para buscar la respuesta.

El camino para responder a los objetivos propuestos se desarrolla en el siguiente planteamiento.

#### **En el apartado material y método:**

Elección de modelo experimental: Se ha elegido la rata, por ser este animal en el que se han realizado los estudios previos; de este modelo conocemos las respuestas biológicas. Como donante se ha usado rata macho joven. Como receptor se ha usado rata hembra.

Tipo de estudio. Se propone un estudio de tipo cualitativo. Ayudados por la experiencia previa y del conocimiento de la respuesta biológica del modelo de animal permite una reducción del número de animales por grupo.

Sujeto de estudio: placa de crecimiento.

Región de estudio: Extremidad anterior izquierda de la rata. Placa de crecimiento distal del radio.

Edad del animal. Donante de placa de crecimiento: rata de 15 días edad.

Donante de hueso: Diáfisis radio, rata de 15 días.

Diáfisis radio, rata de 1 mes.

Diáfisis tibia, rata de 3 meses.

Receptor: rata de 1 mes.

Pre-ensayos: Tras la elección del modelo experimental, se han realizado distintos estudios experimentales en un grupo de animales con el objetivo de

perfilear, o afinar, y corregir las diferentes técnicas quirúrgicas y de inmovilización a emplear.

Se han propuesto los siguientes grupos experimentales:

**En el primer objetivo**, el alotrasplante de placa de crecimiento ha sido avascular y ortotópico, todos los grupos de estudio se estudian con un periodo de seguimiento de 6 y 12 semanas. Se han planteado los siguientes grupos:

Resección de la placa de crecimiento. En este grupo, el seguimiento se ha realizado a las 12 semanas.

Alotrasplante de placa de crecimiento en fresco, sin tratamiento con células MSC.

Alotrasplante de placa de crecimiento en fresco, con tratamiento con células MSC.

Alotrasplante de placa de crecimiento crioconservado, sin tratamiento con células MSC.

Alotrasplante de placa de crecimiento crioconservado, con tratamiento con células MSC.

**En el segundo objetivo**, los alotrasplantes combinados de placa de crecimiento y hueso han sido avasculares y ortotópicos. En todos los grupos el seguimiento post-ensayo ha sido de 12 semanas. En este grupo todos los animales han sido tratados con un fármaco inmunosupresor. Se han planteado los siguientes grupos:

Alotrasplante combinado en fresco, parcial de epífisis, placa de crecimiento y diáfisis (donante 15 días); todo unido.

Alotrasplante combinado en fresco, placa de crecimiento, donante de 15 días y diáfisis; todo unido.

Alotrasplante combinado en fresco, placa de crecimiento donante de 15 días con diáfisis; ambos separados.

Alotrasplante combinado en fresco, placa de crecimiento con diáfisis, donante de 1 mes; ambos separados.



Alotrasplante combinado en fresco, placa de crecimiento con diáfisis, donante de 3 meses (tibia); ambos separados.

Procedimiento quirúrgico. Anestesia general. Preparación mediante lavado con clorhexidina de la piel. Bajo lupa estereoscópica, mínima incisión longitudinal en borde radial, distal, antebrazo izquierdo. Disección por planos y localización de la zona a intervenir. Según el tipo de ensayo resección y extracción de placa de crecimiento, extracción de segmento de radio con epífisis, placa y diáfisis.

A continuación se colocan los injertos, según el tipo de ensayo. La placa de crecimiento nunca se ha fijado. En el hueso siempre se ha realizado una osteosíntesis intramedular con una aguja. Lavado con líquido antibiótico y aplicación de terramicina en polvo en la zona quirúrgica. Cierre de la piel. Colocación de una férula, en tubo, de plástico, unida a piel por unos puntos de seda. Después de la intervención, y en los primeros días de seguimiento se administra tratamiento antiinflamatorio y analgésico.

Tratamiento post-quirúrgico. En los grupos señalados en el objetivo primero, se han administrado  $250 \times 10^3$  células MSCs por rata, en la vena lateral del rabo. En los grupos del segundo objetivo se ha administrado un fármaco inmunosupresor a todos los animales.

Tras la eutanasia del animal, según procedimiento establecido por la ley, se han aislado ambas extremidades anteriores y se ha realizado estudio radiológico en el plano antero-posterior y en el plano lateral. Se han establecido una serie de parámetros radiológicos de medidas de longitud y de ángulos, con especial atención a los que hacen referencia a la placa de crecimiento.

Extracción de los huesos del antebrazo, para procesamiento en histología. La lectura histológica se ha realizado centrada, fundamentalmente, en datos de arquitectura tisular de la placa de crecimiento y de las células, condrocitos.

### **En el apartado Resultados:**

Lectura de resultados. Los resultados se valoran, fundamentalmente, sobre los datos cualitativos extraídos. En los casos que se han extraído datos cuantitativos se aplican pruebas estadísticas.

Los resultados se expresan según los objetivos propuestos.

**En el apartado Discusión:**

Discusión. Se realiza el análisis de los resultados obtenidos, tanto en un aspecto común de ellos, así como en aspectos puntuales que aporten, respondiendo y analizando los objetivos propuestos.

**En el apartado Conclusión:**

Conclusión. Se aportan las conclusiones, específicas, a los objetivos propuestos, respondiendo a las hipótesis planteadas.

**En el apartado Resumen:**

Resumen. Se aporta resumen abreviado del trabajo.

**En el apartado bibliografía:**

Bibliografía. Se aporta la bibliografía usada tanto en la primera labor de síntesis realizada, como en la del análisis que se aporta.

## **4 MATERIAL Y MÉTODO**

## **4.1 MATERIALES Y REACTIVOS**

### **4.1.1 Animales**

Se han utilizado ratas no consanguíneas de la cepa Sprague Dawley, machos y hembras, criados en las instalaciones del Gabinete Veterinario de la Universidad Autónoma de Madrid, con número de registro EX-021-U.

Todos los procedimientos realizados con estos animales cumplen con la legislación vigente reflejada en el R.D. 1201-2005 10 Octubre, *sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos*.

Así mismo estos procedimientos han sido aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad Autónoma de Madrid.

### **4.1.2 Condiciones de estabulación**

Los animales han sido mantenidos durante el estudio en las siguientes condiciones.

Jaulas de policarbonato autolavables. Dimensiones 266 X 214 X 143 mm. Superficie del suelo 360 cm<sup>2</sup> con capacidad de hasta 4 animales. El suelo de las jaulas, está cubierto de serrín, que se renueva cada 3 días. El techo de la jaula está formado por un enrejado de acero inoxidable que permite el depósito de alimento y bebida.

Biberones de polietileno de 500mL de capacidad.

Condiciones ambientales: Humedad relativa 55% +/- 10%. Temperatura 19 ± 1 °C. Renovaciones de aire por hora: 20. Ciclo lumínico: 12 horas de luz, 12 horas de oscuridad.

Alimentación y bebida: mantenidos con pienso de mantenimiento A04/ Panlab y agua de bebida *ad libitum*.

Todas las jaulas donde se han alojado los animales han estado identificadas. Las jaulas están dispuestas en estanterías en salas con control de temperatura y humedad aisladas del resto de los animales no intervenidos en el Gabinete Veterinario de la Universidad Autónoma de Madrid.

#### **4.1.3 Aparatos**

- Cabina de rayos X, Hewlett-Packard, modelo Cabinet X-ray nº 43855N Faxitron Series.
- Reveladora automática convencional AGFA. Modelo CURIX 60.
- Cámara fotográfica Canon SLR.
- Lupa estereoscópica con transiluminación marca Leitz modelo HM-LUX3.
- Microscopio estereoscópico Cambridge instrument modelo Z30E.
- Ordenador: HP Pavillion dv6 Notebook PC.
- Tanque de nitrógeno líquido. Tanque situado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.
- Baño termostático Selecta Mod Precisdig.
- Cabina de flujo laminar Clase II Telstar Mod. Bio-II-A/P.
- Centrifuga Beckman Coulter Modelo Allega X12R.
- Dispensador de Parafina Selecta.
- Estufa de cultivo Selecta Modelo Incudigit 52L.
- Incubador de CO2 Nuaire modelo UN-4850.
- Microtomo mecánico Leica modelo Jung RM 2025.

#### **4.1.4 Materiales**

- Aguja de insulina 0.33x8mm.
- Hojas desechables de bisturí nº 11.
- Hemoscetas Medtronic.
- Hilo de sutura Vycril 5/0 con aguja triangular.

- Hilo de sutura Seda 2/0 con aguja recta triangular.
- Pipetas de plástico para la fabricación de la férula.
- Instrumental quirúrgico convencional.
- Instrumental quirúrgico de microcirugía.
- Cuchillas desechables de micrótopo Feather R35.
- Papel radiográfico Kodak X OMAT MA film 18X22mm.
- Programa de tratamiento de datos Office Microsoft 2007.
- Programa de tratamiento de imágenes Picasa.
- Programa de medición de imágenes Image J. National Institutes of Health.
- Programa de análisis estadístico SPSS versión 15.0.

#### **4.1.5 Medios de criopreservación y medios de cultivo**

- DMSO Dimetil sulfóxido a una concentración 2M. Utilizado para la criopreservación de la placa de crecimiento.
- Medio de cultivo MSC: medio Eagle modificado por Dulbecco bajo en glucosa (*Dulbecco's modified Eagle Media Low Glucose*, DMEN-LG), suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO BRL) Glutamina (2 mM) 400µM de aminoácidos no esenciales, 0,01% de estreptomina, 0,06% de penicilina G y 50 µg/ml de gentamicina, 1 g/l de glucosa y suero seleccionado para estas células.
- Medio Eagle modificado por Dulbecco básico (*Dulbecco's modified Eagle Media*, DMEN) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO BRL) Glutamina (2 mM) 400µM de aminoácidos no esenciales, 0,01% de estreptomina, 0,06% de penicilina G y 50 µg/ml de gentamicina, 10 g/l de glucosa y suero seleccionado para estas células.

#### 4.1.6 Soluciones y reactivos

- Bromo-deoxiuridina (BrdU): 5-bromo-2deoxiuridina. Sigma.
- Anti-BrdU/nucleasa: anticuerpo anti 5-2'-Bromodeoxiuridina de origen murino 130µl.
- Buffer formalina al 7%: fosfato sódico 4,55 g; fosfato disódico 6,55; formol comercial (40%) 70ml; agua destilada 930 ml.
- Eosina alcohólica: eosina 1gr, etanol 96° 100 ml. (Quimipur, Merck, Panreac, España).
- Hematoxilina de Carazzi (Quimipur, Merck, Panreac, España).
- Formol neutro tamponado Al 10%.
- Parafina marca Paraplast Plus, Tissue Embedding Médium. McCormick Scientific, Ref 502004, U.S.A.
- Solución de Clorhexidina al 2%.
- Alcohol 70%.
- Suero salino fisiológico. Presentación en botes de vidrio de 500ml
- Ibuprofeno en solución 2mg/ml (Dalsy).
- Buprenorfina (Buprex ®) 1 mg/kg.
- Solución anestésica: Ketamina (Ketolar) 50mg/ml, Xilacina (Rompun ®) solución inyectable al 2% 10ml, Atropina 1mg. La mezcla anestésica contiene Ketamina 3.2ml, Xilacina 1ml, Atropina 0.1ml. La solución se ha empleado mediante la inyección intramuscular en la extremidad trasera del animal a la dosis de 0.1 ml/25g de peso de la rata.
- Tracrolimus (Prograf ®) 1mg. Solución a una concentración de 0,1-mg/kg/día.
- Suero fetal bovino (GIBCO BRL).

#### 4.1.7 Distribución y número de animales utilizados

Se han utilizado ratas SD hembras en un total de 123 animales distribuidos en los siguientes grupos:

##### **Modelo experimental 1: trasplante avascular de placa de crecimiento fresco, crioconservado con o sin células.**

Se han utilizado ratas SD hembras en un total de 81 animales distribuidos en los siguientes grupos:

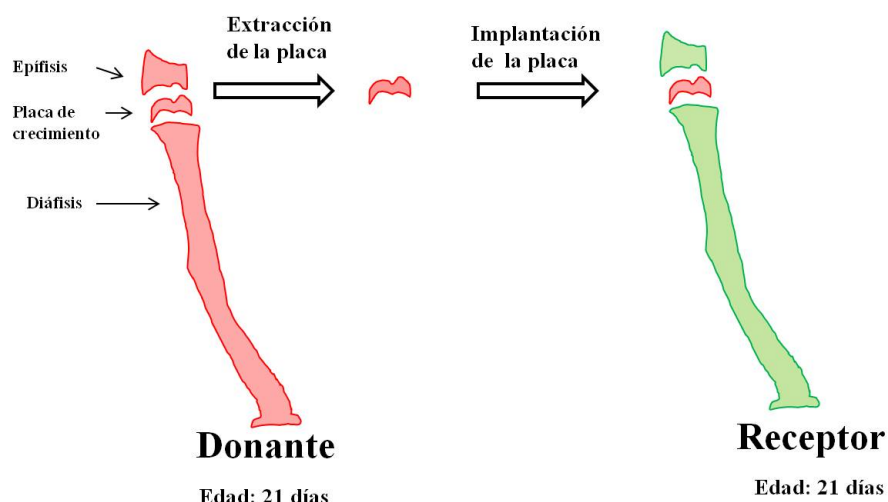
Extracción de las placas de crecimiento para la criopreservación en nitrógeno líquido:

15 machos de 15 días de edad. Obtención de 30 placas de crecimiento.

##### **Trasplante en fresco ortotópico avascular de placa de crecimiento de radio distal (Esquema 1):**

Grupo de 6 semanas: 8 ratas hembra de 21 días de edad.

Grupo de 12 semanas: 13 ratas hembra de 21 días edad.



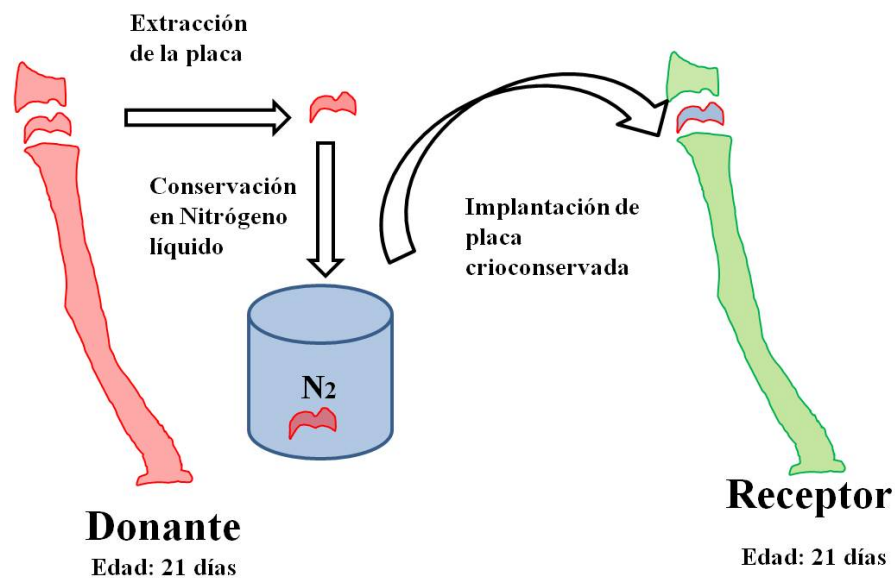
**Esquema 1.** Esquema de la intervención trasplante en fresco ortotópico avascular de placa de crecimiento de radio distal.



**Trasplante criopreservado de placa de crecimiento de radio distal (Esquema 2):**

Grupo de 6 semanas: 7 ratas hembra de 21 días de edad.

Grupo de 12 semanas: 12 ratas hembra de 21 días de edad.

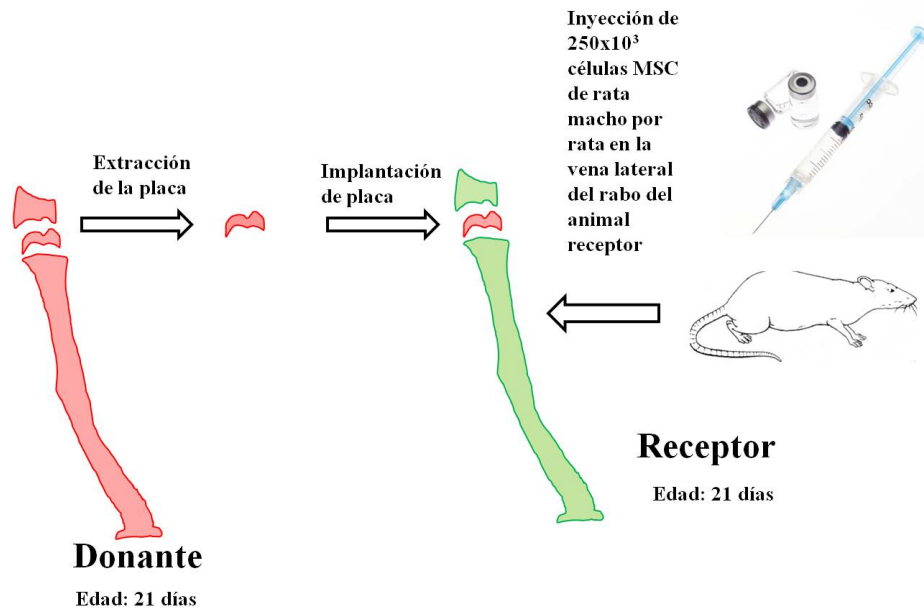


**Esquema 2.** Esquema de la intervención trasplante en criopreservado ortotópico avascular de placa de crecimiento de radio distal.

**Trasplante en fresco ortotópico avascular de placa de crecimiento de radio distal con aporte de células MSC (Esquema 3):**

Grupo de 6 semanas: 12 ratas hembra de 21 días de edad.

Grupo de 12 semanas: 10 ratas hembra de 21 días edad.

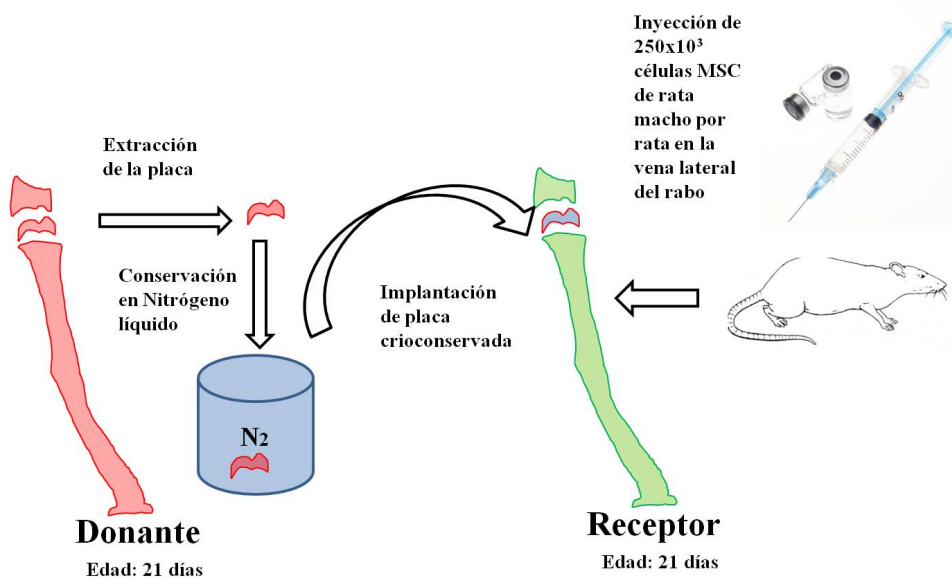


**Esquema 3.** Esquema de la intervención trasplante en fresco ortotópico avascular de placa de crecimiento de radio distal con aporte de células MSC.

### Trasplante criopreservado de placa de crecimiento de radio distal con aporte de células MSC (Esquema 4):

Grupo de 6 semanas: 10 ratas hembra de 21 días de edad.

Grupo de 12 semanas: 8 ratas hembra de 21 días de edad.



**Esquema 4.** Esquema de la intervención trasplante criopreservado ortotópico avascular de placa de crecimiento de radio distal con aporte de células MSC.

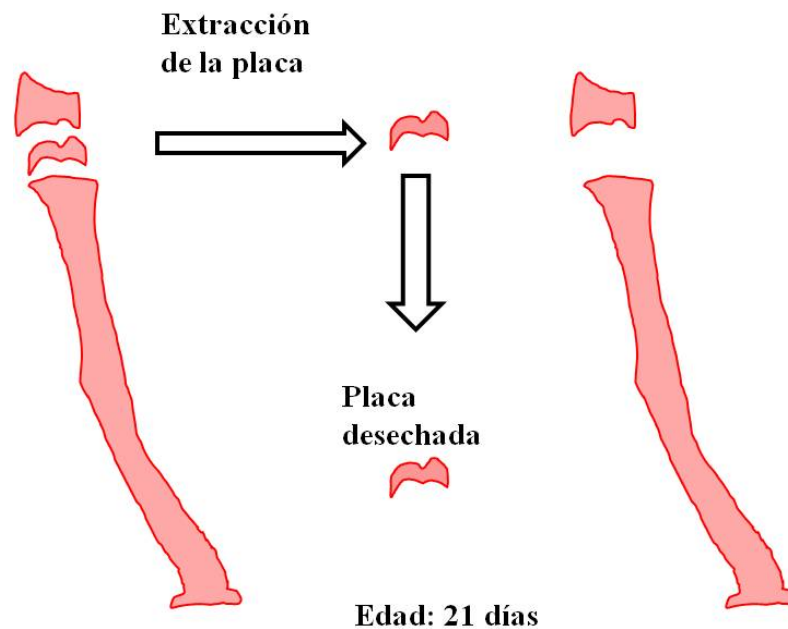
## **Modelo experimental 2: trasplante avascular de placa de crecimiento combinado con diferentes tipos de aloinjerto**

### **Grupo control:**

7 ratas hembra de 21 días de edad.

### **Resección de la placa de crecimiento (D) (Esquema 5)**

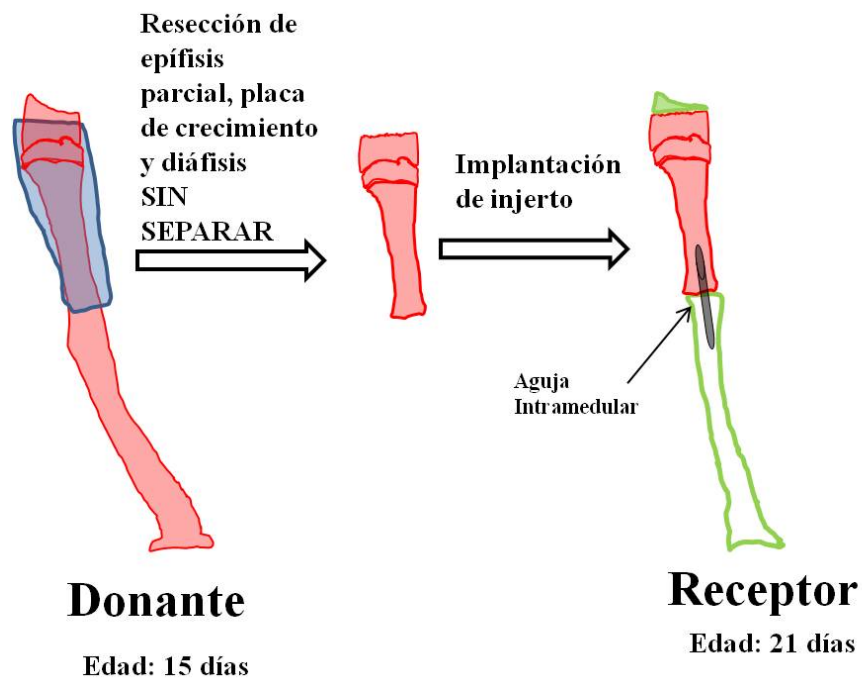
7 ratas hembra de 21 días de edad



**Esquema 5.** Esquema de la intervención resección de placa de crecimiento de radio distal

### **Grupo Trasplante completo de epífisis-placa-metáfisis-diáfisis (E) (Esquema 6)**

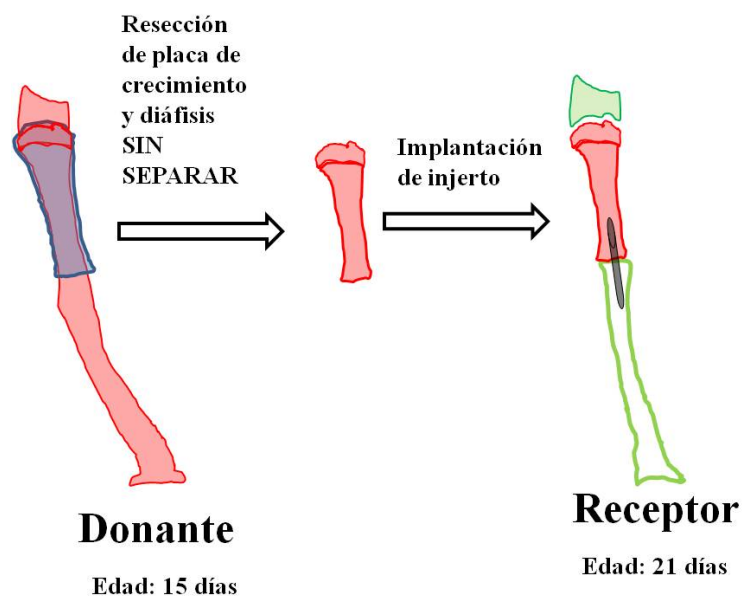
7 ratas hembra de 21 días de edad.



**Esquema 6.** Esquema de la intervención Resección de epífisis parcial, placa de crecimiento y diáfisis sin separar.

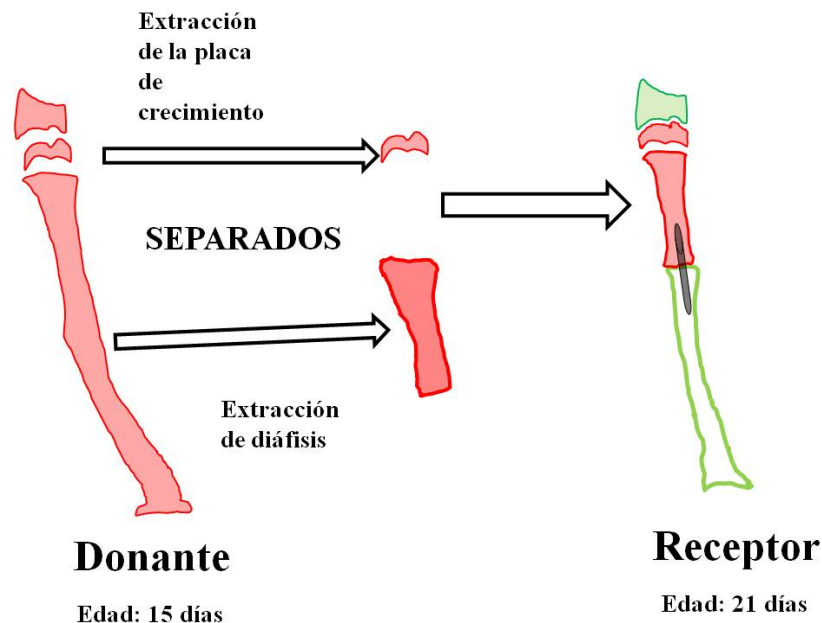
**Grupo Trasplante de placa y hueso sin separar en fresco (G)**  
**(Esquema 7):**

14 ratas hembra de 21 días de edad.



**Esquema 7.** Esquema de la intervención trasplante de placa de crecimiento y diáfisis sin separar en fresco.

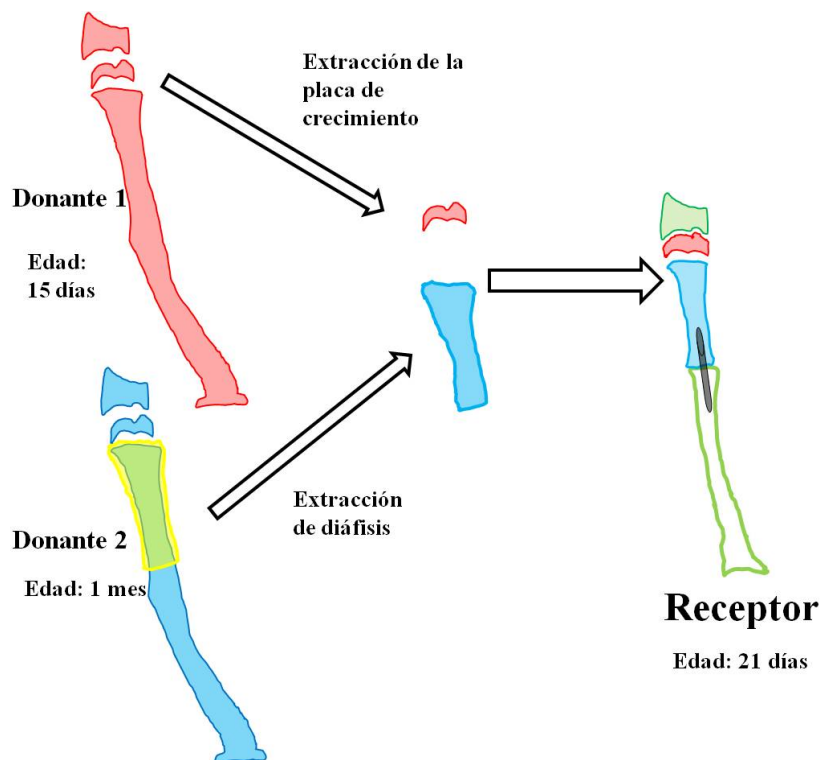
**Grupo Trasplante de placa de crecimiento, metáfisis y diáfisis (parcial) ambos separados (F) (Esquema 8):**



**Esquema 8.** Esquema de la intervención Trasplante de placa de crecimiento, metáfisis y diáfisis (parcial) ambos separados.

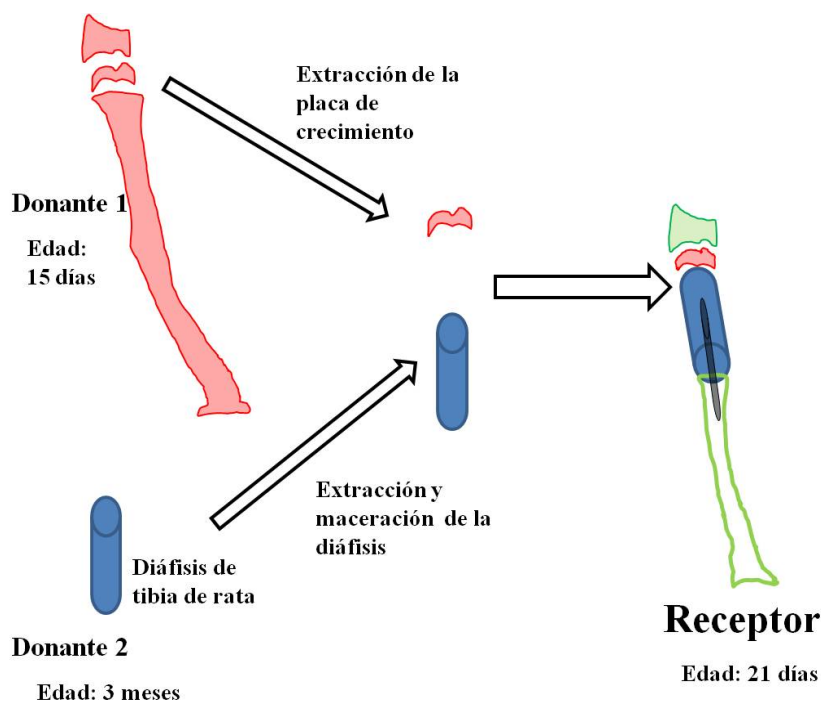
**Grupo trasplante de placa de crecimiento con distintos donantes de placa y hueso (C): (Esquemas 9 y 10):**

7 ratas hembra de 21 días de edad.



**Esquema 9.** Esquema de la intervención trasplante de placa de crecimiento con distintos donantes de placa y hueso (C-A).

En dos animales se realizó un aloinjerto de tibia de rata (grupo C-B).



**Esquema 10.** Esquema de la intervención trasplante de placa de crecimiento con distintos donantes de placa y hueso donde se ha utilizado un aloinjerto de tibia de rata.

## **4.2 MÉTODOS**

### **4.2.1 MODELO EXPERIMENTAL 1: trasplante avascular de placa de crecimiento fresco, crioconservado con o sin células**

#### **4.2.1.1 Animales: anestesia tratamiento y eutanasia**

##### **Anestesia de los animales**

Los animales utilizados han sido anestesiados mediante inyección intramuscular en la extremidad trasera con una mezcla de Ketamina (Ketolar ®) 0,05 mg/kg, Xilacina (Rompun ®) solución inyectable al 2% 10ml, Atropina 1mg. Dosis de 0.1 ml/25g de peso de la rata.

##### **Analgesia postoperatoria**

Se ha aplica mediante una inyección subcutánea Buprenorfina (Buprex ®) 1mg/Kg.

En el agua de bebida se añaden 3 ml de Ibuprofeno en jarabe (Dalsy ®) que se mantiene durante las primeras 48h del postoperartorio.

##### **Administración de BrdU**

A todos los animales sometidos a ensayo se les ha administrado BrdU a dosis de 50 mg/kg de peso de animal en solución salina isotónica estéril, dos horas previas a la eutanasia.

##### **Eutanasia de los animales**

Los animales fueron sacrificados en los distintos períodos de tiempo establecidos para cada grupo en cámara con atmósfera de CO<sub>2</sub>.

Una vez sacrificado se tomaron fotografías para determinar el aspecto morfológico macroscópico de las extremidades superiores, así como la medición de los parámetros clínicos de movilidad articular. Posteriormente se realiza una desarticulación interescapulotoracica de las extremidades delanteras. Se retira la piel y se realiza una fotografía de la extremidad. Después se procede a la esqueletización de las piezas, se toman fotografías de éstas y procede al análisis

radiográfico. Posteriormente se introducen las piezas en formalina para comenzar el proceso de decalcificación.

#### **4.2.1.2 Creación del banco de placas de crecimiento criopreservadas**

Tras la eutanasia de cada animal mediante la introducción de éste en cámara de CO<sub>2</sub> se prepara la piel de ambas extremidades con antiséptico local (solución de clorhexidina y alcohol). Bajo visión directa con lupa binocular se realiza un abordaje radial y disección por planos hasta llegar a la fisis distal del radio. Con una hoja de bisturí del número 11 se realiza un corte perpendicular al eje longitudinal fisario a nivel distal y uno paralelo a éste en la unión metafisaria conservando parte de la región metafisaria para permitir la correcta orientación en el momento de la implantación en el animal receptor.

Una vez retirada la placa de crecimiento se introduce en un criovial con una solución de suero fetal bovino con 10% de DMSO. El criovial es introducido en un congelador a -20°C y tras 3 horas es llevado al tanque de nitrógeno líquido donde permanecerá almacenado a -195°C. En cada tubo de Eppendorf se almacenan cuatro placas de crecimiento.

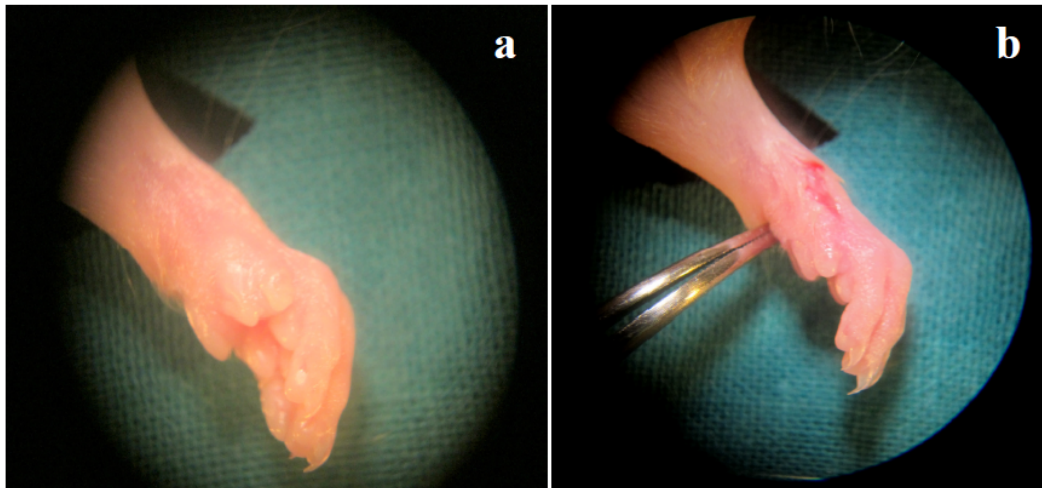
#### **4.2.1.3 Intervención quirúrgica**

Se utilizan ratas hembras de la especie SD de 21 días de edad. Se interviene siempre la extremidad delantera izquierda. Se procede a anestesiarse al animal según la técnica descrita previamente. La piel se prepara con antiséptico local (solución de clorhexidina y alcohol).

#### **Extracción de la placa de crecimiento**

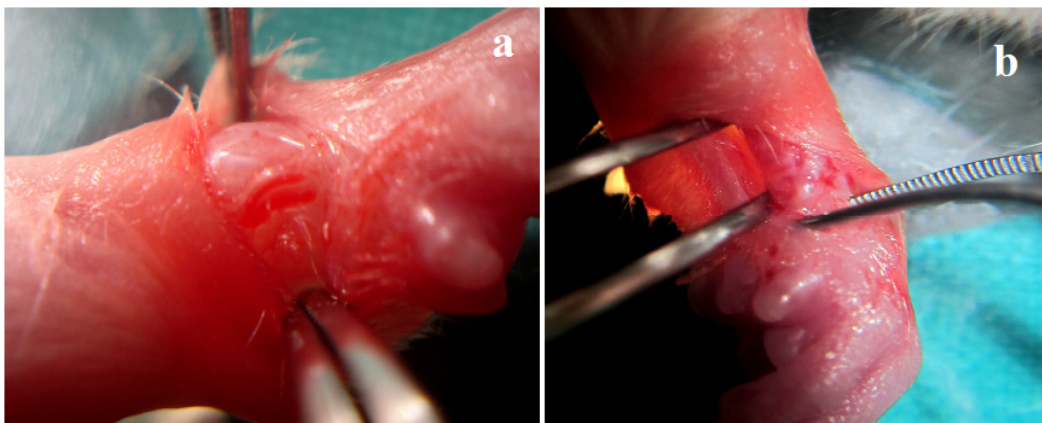
La intervención se realiza con lupa binocular. Bajo iluminación directa el animal se posiciona en decúbito lateral izquierdo. Se realiza una incisión en la región radial a nivel fisario. (Fig 4.1)





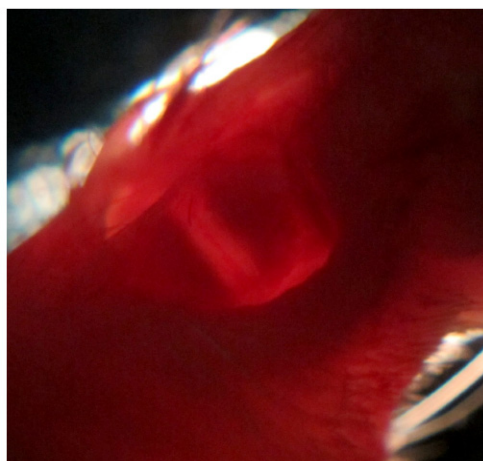
**Figura 4.1** a) Extremidad en posición lateral. b) Incisión en región radial.

Se realiza una disección roma de las estructuras vasculonerviosas identificando los tendones y vasos que existen a dicho nivel. Se luxan hacia dorsal el tendón del abductor del primer dedo y hacia volar el flexor radial del carpo con el objetivo de permitir una correcta exposición de la fisis (Fig 4.2).

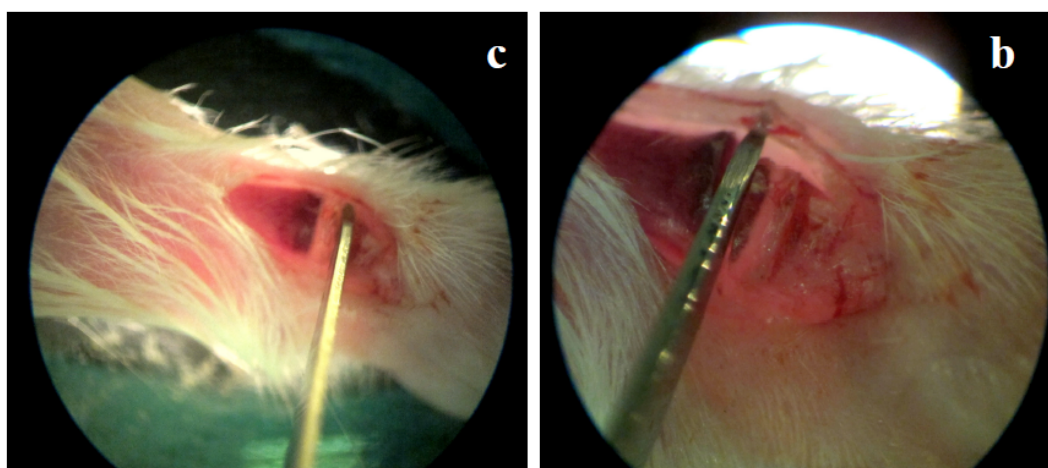


**Figura 4.2** a) Identificación del paquete vasculonervioso radial. b) Disección tendinosa.

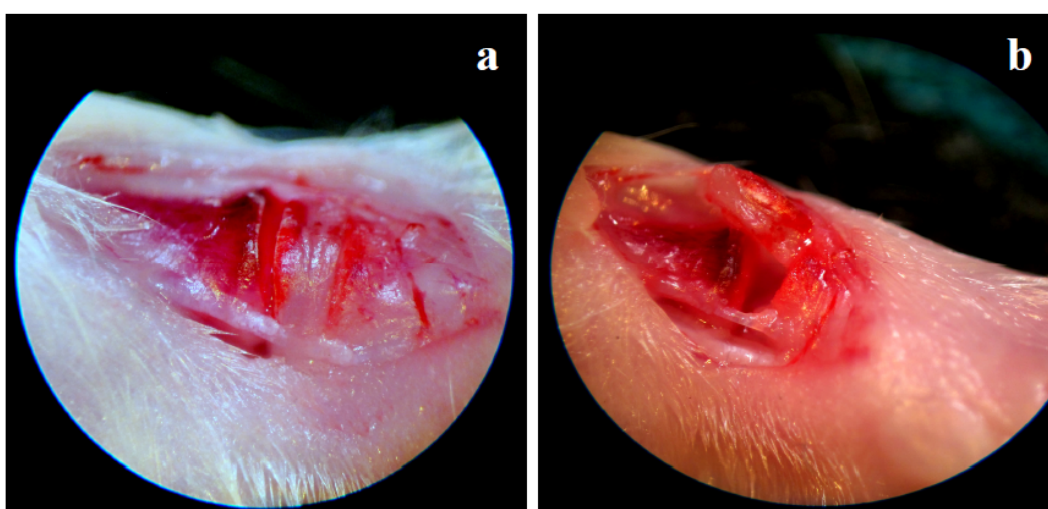
En este momento se apaga la iluminación directa y se conecta la transiluminación para poder identificar correctamente la placa (Fig 4.3). Con un bisturí del numero 11 se realiza la sección de la placa a nivel proximal se conserva una pequeña parte de hueso metafisario unido a la placa para poder realizar una correcta identificación de las partes en el momento de la implantación en el receptor. (Figs 4.4 y 4.5) Posteriormente se disea la placa de crecimiento en la zona volar hasta que ésta queda completamente separada y se puede extraer sin dificultad.



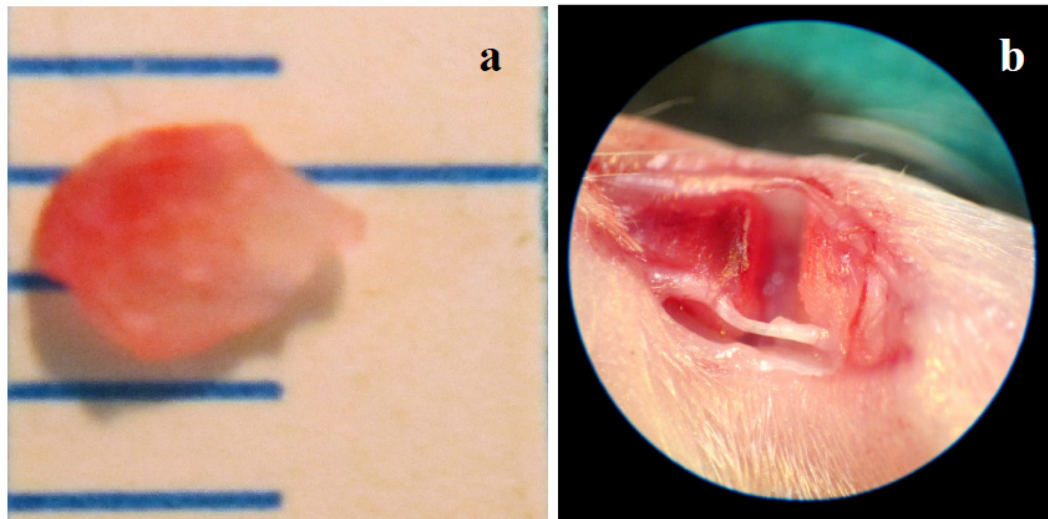
**Figura 4.3** Identificación de la placa de crecimiento por transiluminación.



**Figura 4.4** a) Corte distal de la placa. b) Corte proximal de la placa con resto metafisario.



**Figura 4.5** a) Placa seccionada. b) Placa separada preparada para la extracción.



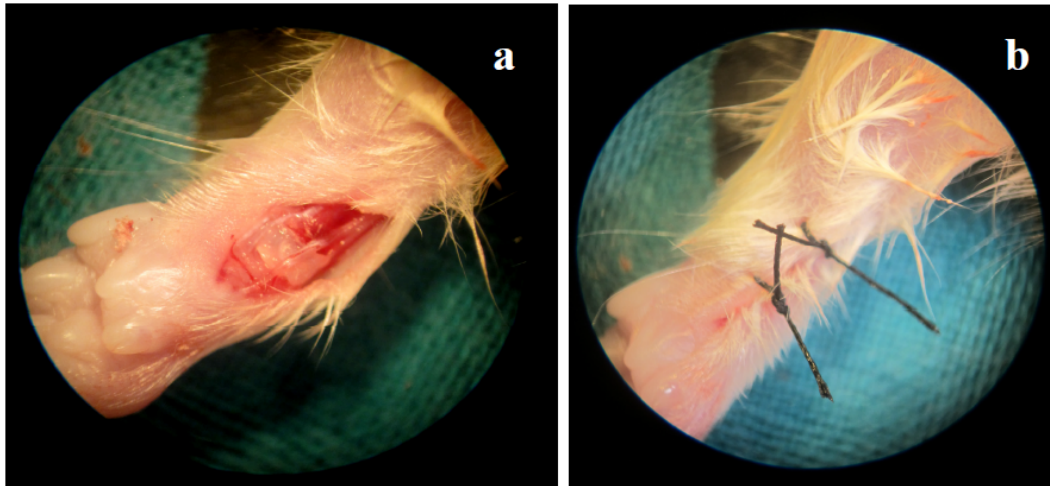
**Figura 4.6** a) Placa extraída. b) Lecho quirúrgico.

Una vez extraída se deposita de inmediato en suero fisiológico. En el lecho quirúrgico se interpone una gasa para realizar hemostasia y mantener el espacio necesario para la posterior implantación de la placa donante. La intervención se realiza por parejas de animales de tal modo que una de las placas extraídas se implanta en el otro animal y viceversa (Fig 4.6).

#### **Implantación de placa donante en trasplante en fresco**

Se toma una placa, se expone esta bajo la lupa binocular y se identifican las regiones epifisaria y metafisaria. Se introduce la placa donante en el lecho quirúrgico previa retirada de la gasa. Una vez introducida se reducen las estructuras tendinosas que contienen la placa implantada. La piel se sutura con sutura multifilamento reabsorbible (Vycril) de 5/0 (Fig 4.7).





**Figura 4.7** a) Implantación de la placa. b) Cierre de la piel.

Inmediatamente se feruliza la extremidad intervenida con una férula circular de plástico adaptada a la longitud de la extremidad. Ésta se fija al animal con una seda de 2/0 tres puntos. El primer punto mantiene la extremidad en tracción longitudinal a través de la región metacarpiana. Los otros dos puntos se realizan en la región dorsal y axilar. La férula se rodea con cinta adhesiva para proteger las suturas. La férula se mantiene una semana (Fig 4.8).



**Figura 4.8** Ferulización postoperatoria.

### **Implantación de las placas crioconservadas**

La técnica quirúrgica empleada es la misma que para el grupo del trasplante en fresco las únicas diferencias se encuentran en el momento de la implantación de la placa de crecimiento criopreservada.

Dos horas antes de la intervención se extraen del tanque de nitrógeno líquido los tubos con las placas de crecimiento necesarios para la intervención y se depositan en una cámara a -20°C, 30 minutos antes de la intervención se extraen y se resuspenden en suero salino fisiológico hasta que alcanzan temperatura ambiente. Tras la identificación bajo visión directa en la lupa binocular de los lados epifisario y metafisario se realiza la implantación en el animal receptor.

#### **4.2.1.4 Aislamiento y cultivo de células MSC. Tratamiento con células MSC**

##### **Aislamiento de células MSCs**

Para el aislamiento de células mesenquimales (MSCs) se utilizaron ratas SD macho de 15 a 21 días de edad. Tras la eutanasia de los animales, bajo condiciones de esterilidad y cabina de flujo laminar y mechero de CO<sub>2</sub> se extrajeron los huesos tubulares (fémur) y tras la esqueletización de las piezas y osteotomía a nivel diafisario se realizó la extracción de la médula ósea. La médula ósea se extrajo del fémur de ratas insuflando PBS estéril con la ayuda de una jeringa. El tejido medular se sembró en una placa de Petri con medio de cultivo en DMEM-LG (Dulbeccos's Modified Eagle medium-Low Glucose, con un 1g/l de glucosa), suplementado con PBS al 10%, y se seleccionó por su capacidad de adhesión al plástico. Tras 10 días desde la siembra fueron observados y en 2-3 semanas se realizó el primer pase. Las células empleadas en los trasplantes se utilizaron después de 3 pases.

##### **Cultivo de células mesenquimales**

Las células fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2mM de Glutamina 400 µM de aminoácidos no esenciales, estreptomycin a una concentración de 0,01%, penicilina G a una concentración de 0,06%, 50 µg/ml de gentamicina y 1g

de glucosa por litro más suero seleccionado para estas células. Los cultivos primarios fueron mantenidos a 37°C, 7% de CO<sub>2</sub> y 97% de humedad relativa. Durante el crecimiento de las células el medio fue reemplazado dos veces por semana, una vez conseguida la expansión, las células fueron despegadas con solución de EDTA-Tripsina, resuspendidas en DMEN básico.

#### **Tratamiento post-quirúrgico.**

En los grupos señalados, se han administrado 200x10<sup>3</sup> células MSC de rata macho suspendidas en un volumen de 0,5 ml por vía intravenosa por la vena lateral del rabo tras la intervención.

#### **4.2.1.5. Protocolo postoperatorio**

Al finalizar la intervención se administra la pauta analgésica. El animal se ubica en una jaula con una fuente de calor inferior en posición de decúbito lateral.

Diariamente se realiza un control de los animales en el que se valora el estado postoperatorio y el estado de la extremidad intervenida y estado de la férula.

En el séptimo día del postoperatorio se retira la férula que permite la libre movilidad de la extremidad.

#### **4.2.1.6 Eutanasia de los animales**

Se realiza según la técnica descrita en el aparatado anterior.

#### **4.2.1.7 Análisis clínico de la extremidad**

En el estudio clínico de la extremidad se analizan los siguientes parámetros de las dos extremidades delanteras de cada animal.

**Parámetros macroscópicos:** aspecto general, desviación del carpo o alteraciones macroscópicas.

- Flexión dorsal de la muñeca. Rango de movilidad 0-95°.

- Flexión volar de la muñeca. Rango de movilidad 0-125°.
- Supinación del antebrazo. Rango de movilidad 0-20°.
- Pronación del antebrazo. Rango de movilidad 0-15°.
- Extensión del codo. Rango de movilidad 0-15°.
- Flexión del codo. Rango de movilidad 0-120°.
- Diámetro del antebrazo medido en mm.
- Diámetro del brazo medido en mm.

#### **4.2.1.8 Análisis radiográfico**

Se realiza mediante proyecciones anterior de antebrazo y lateral de antebrazo incluyendo las articulaciones del codo y radiocarpiana.

Las radiografías se realizan en un aparato de rayos X Hewlett-Packard, modelo Cabinet X-ray nº 43855N Faxitron Series. Se utiliza una intensidad de 15 Kv y un tiempo de exposición de 15 segundos. El papel radiográfico utilizado es Kodak X OMAT MA film 18X22mm. La escala empleada es 1:1.

La fotografía se realiza con el papel radiográfico sobre un negatoscopio con la cámara réflex digital con objetivo macro estabilizada con un soporte vertical regulable en altura. Al lado de cada radiografía se colocó una regla milimetrada para poder realizar las mediciones posteriores (Fig 4.9).



**Figura 4.9** Radiografías en las proyecciones Anteroposterior y lateral de antebrazo de rata.

### **Valoración cualitativa**

En la radiografía la placa de crecimiento del radio distal se observa como una línea radiotransparente. La valoración se realizó sobre una fotografía digital de la radiografía en papel previo al análisis cuantitativo.

La valoración cualitativa consistió en describir las anomalías radiográficas observadas como son la desviación de la articulación radiocarpiana y anomalías de la región fisaria radiocubital distal.

### **Valoración cuantitativa**

Se realizó una valoración cuantitativa de la evolución de los trasplantes a diferentes tiempos mediante una serie de medidas comparativas entre la extremidad no intervenida (control) y la trasplantada (caso).

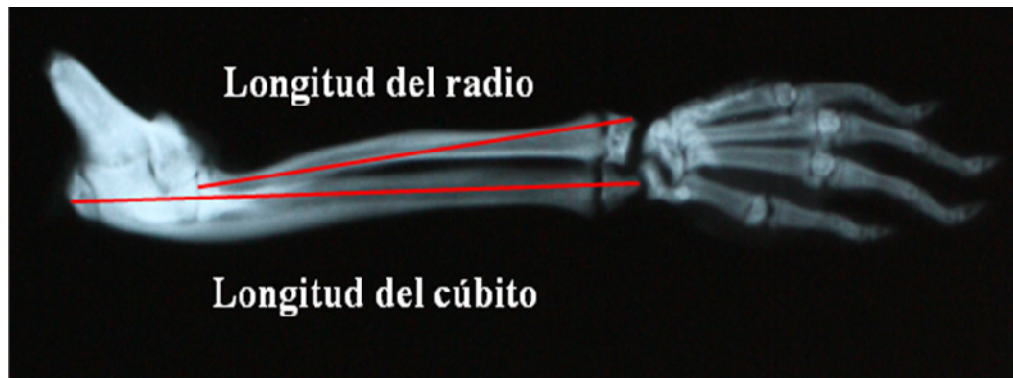
Las mediciones se realizaron con el programa "Image J". La escala radiológica es 1:1.

Las medidas de longitud están indicadas en mm y las angulares en grados. Todas las medidas se expresan con dos decimales. Los parámetros medidos fueron los siguientes:



**Longitud del cúbito (mm):** medida desde la apófisis del olecranon hasta la apófisis de la estiloides cubital (Fig 4.10)

**Longitud del radio (mm):** medida desde la superficie articular de la cabeza radial hasta la apófisis de la estiloides radial (Fig 4.10)



**Figura 4.10** Medición radiológica en la proyección anteroposterior de la longitud del cúbito y del radio.

**Longitud del eje proximal radio (mm):** medida por la línea perpendicular al plano articular de la cabeza radial prolongada distalmente hacia la diáfisis hasta la cortical de la diáfisis radial (Fig 4.11).

**Longitud del eje distal radio (mm):** medida por la línea perpendicular al plano articular de la epífisis del radio distal prolongada proximalmente hacia la diáfisis hasta la cortical de la diáfisis radial (Fig 4.11).



**Figura 4.11** Medición radiológica de la longitud en la proyección anteroposterior de los ejes proximal y distal del radio.

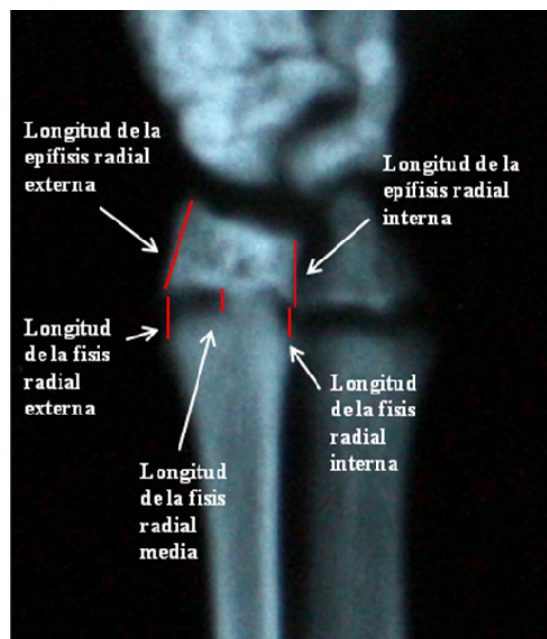
**Longitud de la fisis radial externa (mm):** medida por la línea que une el borde proximal externo de la epífisis del radio con el borde distal externo de la metáfisis radial (Fig 4.12).

**Longitud de la fisis radial media (mm):** medida por la línea perpendicular en el tercio medio de la placa de crecimiento entre el plano radiológico distal de la metáfisis y el plano radiológico proximal de la epífisis (Fig 4.12).

**Longitud de la fisis radial interna (mm):** medida por la línea que une el borde proximal interno de la epífisis del radio con el borde distal interno de la metáfisis del radio (Fig 4.12).

**Longitud de la epífisis radial externa (mm):** medida por la línea que recorre el borde externo de la epífisis del radio (Fig 4.12).

**Longitud de la epífisis radial interna (mm):** medida por la línea que recorre el borde interno de la epífisis del radio (Fig 4.12).



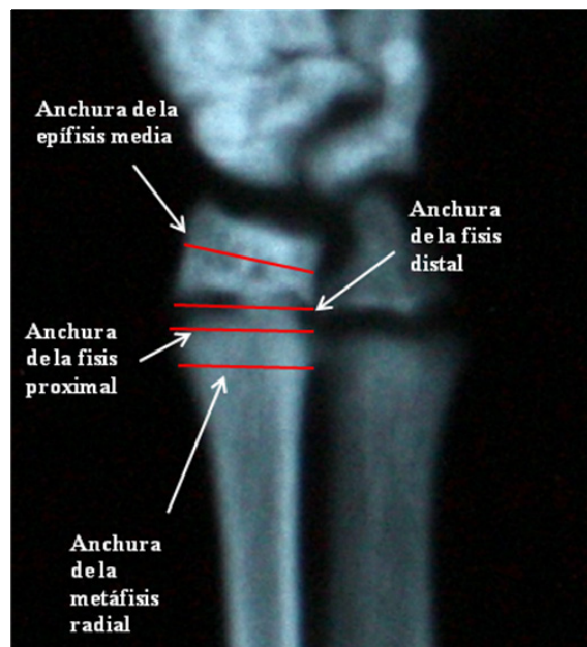
**Figura 4.12** Mediciones radiológicas de la longitud en la proyección anteroposterior de las distintas diferentes regiones de la placa de crecimiento y de la epífisis.

**Anchura de la metáfisis radial (mm):** medida por una línea perpendicular a la diáfisis radial en la zona metafisaria (Fig 4.13).

**Anchura de la fisis proximal (mm):** medida por una línea paralela a la fisis proximal que une los bordes radial y cubital de ésta (Fig 4.13).

**Anchura de la fisis distal (mm):** medida por una línea paralela a la fisis distal que une los bordes radial y cubital de ésta (Fig 4.13).

**Anchura de la epífisis media (mm):** medida por una línea paralela a la epífisis radial que une los bordes radial y cubital de ésta (Fig 4.13).



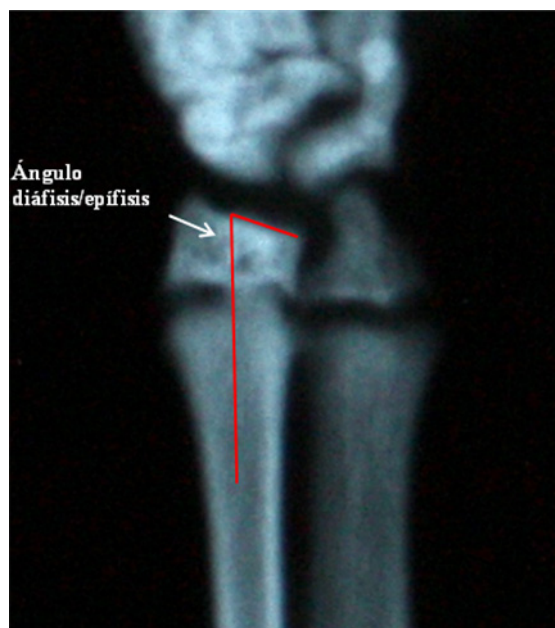
**Figura 4.13** Medición radiológica de las anchura en la proyección anteroposterior de las diferentes regiones de la placa de crecimiento y de la epífisis.

**Ángulo metafisario (grados):** formado por los ejes longitudinales proximal y distal en la metáfisis radial (Fig 4.14).



**Figura 4.14** Medición en la proyección anteroposterior del ángulo metafisario.

**Ángulo diáfisis/epífisis (grados):** formado por el eje longitudinal de la diáfisis con el eje transversal medio de la epífisis radial (Fig 4.15).



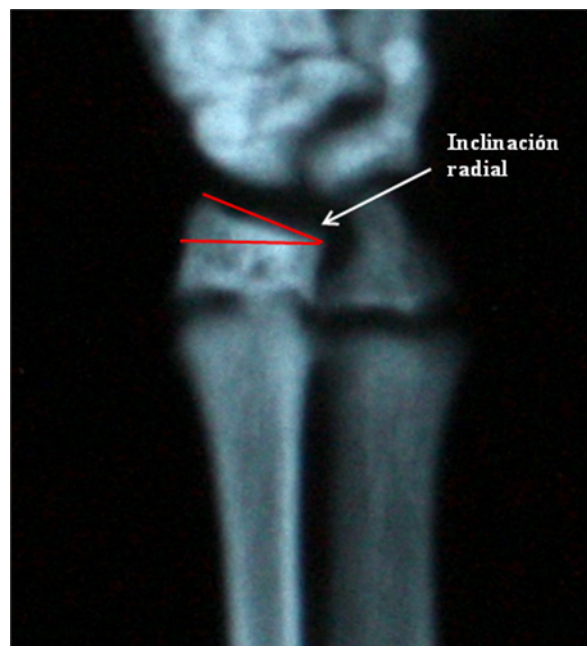
**Figura 4.15** Medición en la proyección anteroposterior del diáfisis epífisis.

**Arco radial máximo:** se obtiene con la siguiente fórmula. Distancia desde la tuberosidad bicipital hasta la perpendicular de la convexidad máxima del radio dividido entre la distancia desde la convexidad máxima del radio hasta la superficie articular del radio distal todo el multiplicado por 100. Se mide en la proyección lateral (Fig 4.16).



**Figura 4.16** Medición del arco radial máximo en la proyección lateral.

**Inclinación radial (grados):** formada por el ángulo entre una línea que une la estiloides radial con la superficie articular radial medial y una línea que parte desde la superficie articular medial que discurre perpendicular al plano longitudinal epifisario (Fig 4.17).



**Figura 4.17** Medición de la inclinación radial en la proyección anteroposterior.

**Inclinación volar (grados):** formado por una línea que une la superficie articular volar con la dorsal y una línea que discurre perpendicular al plano longitudinal epifisario. Se mide en la proyección lateral (Fig 4.18).



**Figura 4.18** Medición de la inclinación volar en la proyección lateral.

#### **4.2.1.9 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS 15.

Las variables cualitativas se presentaron con su distribución de frecuencias. Las variables cuantitativas se resumieron en su media y su desviación estándar (DE).

En cada variable se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnoff con el objetivo de determinar si éstas seguían una distribución normal.

En el caso de que siguieran una distribución normal se analizó el comportamiento de las variables cuantitativas por cada una de las variables independientes categorizadas mediante el test de la t de Student para dos muestras independientes para comparar el nivel de significación de la diferencia entre las muestras, para una probabilidad de 0.05 y n-1 grados de libertad.

Si las variables no se ajustaban a una distribución normal se utilizó el test de la U de Mann-Whitney para dos muestras independientes para comparar el nivel de significación de la diferencia entre las muestras, para una probabilidad de 0,05 y n-1 grados de libertad.



Se realizará un análisis de las variables de cada grupo comparando las extremidades intervenidas con sus contralaterales y posteriormente se compararán las extremidades intervenidas entre los diferentes grupos con el objetivo de determinar si existen diferencias no sólo estadísticamente significativas sino clínicamente relevantes.

#### **4.2.1.10 Método histológico**

##### **Procesamiento de las extremidades**

Se extrae en fresco la extremidad, se elimina la piel y los anejos cutáneos, se toma una fotografía de la extremidad y se realiza el análisis clínico. Posteriormente se realiza el análisis radiográfico.

En un segundo paso se elimina la mayor parte de tejido muscular de la extremidad y se realiza la esqueletización de ésta. La pieza se introduce en formalina al 4% para su fijación, en un período de 72h. Posteriormente se decalcifica la extremidad en ácido nítrico al 5% durante un período de al menos una semana. Tras la decalcificación la pieza se lava en agua durante 20 minutos para eliminar los reactivos previos.

El proceso de inclusión en parafina se realiza siguiendo este protocolo:

Alcohol 70° (30 min) > Alcohol 96° (2-3h) > Alcohol 96° (toda la noche)> Alcohol 100° I (2-4h)> Alcohol 100° II (2-4h)> Acetato de butilo I (2-4h) > Acetato de butilo II (toda la noche).

Las piezas deshidratadas se introducen en parafina I en estufa a 60° C durante 2-4 horas, posteriormente se pasa a parafina II durante otras 2-4h.

Se forma un bloque con la pieza orientada según se ha tallado previamente realizándose cortes seriados de 7 micras de grosor.

Se procede a realizar las diferentes técnicas de tinción.

##### **Tinción de Hematoxilina-Eosina**

Los portas se introducen en la estufa a 59° durante 45 minutos para eliminar el exceso de parafina.

El proceso de tinción seguido es el siguiente:

Xilol I (5-10 min) > Xilol II (5-10 min) > Alcohol 100° (5 min) > Alcohol 96% (5 min) > Alcohol 70° (5min) > Lavado en agua > Hematoxilina Harris (5 min) > Lavado en agua > Eosina Alcohólica (5min) > Alcohol 96% (5 min) > Alcohol 100° (5 min) > Xilol I (5 min) > Xilol II (5 min).

### **Tinción de tricrómico de Masson**

Pasos para la tinción del tricrómico de Masson.

Desparafinado en estufa durante 20 min a 60° y después sumergir en Xilol durante 10 min.

El proceso de tinción seguido es:

Hidratación en Alcohol absoluto (5 min), Alcohol 96° (5min) Alcohol 70° (5min) > Lavar en agua destilada > Hematoxilina (5 min) > Lavado con agua corriente (10 min) > Fucsina de Ponceau (5 min) > Ácido fosfomolibdico (5min) > Ácido fosfomolibdico (5min) > Verde luz (5 a 7min) > Deshidratar Alcohol de 70° Alcohol de 96°.

Resultados:

- Tejido conjuntivo: verde.
- Tejido muscular: pardo.
- Tejido epitelial: rojizo.

#### **4.2.1.11 Método histométrico**

Para la realización de la histometría de la placa se ha utilizado el ocular milimetrado para realizar las mediciones a un aumento de 40X. Se realizan medidas de las diferentes regiones de la placa de crecimiento normal así como de la placa de crecimiento trasplantada para poder realizar un análisis comparativo. Las medidas se expresan en micras.



## **4.2.2 MODELO EXPERIMENTAL 2: aloinjerto combinado de placa de crecimiento y radio distal**

### **4.2.2.1 Intervención quirúrgica del modelo experimental de aloinjerto**

Se utilizan ratas hembras de la especie SD de 21 días de edad. Se interviene siempre la extremidad delantera izquierda. Se procede a anestesiarse al animal según la técnica descrita previamente. La piel se prepara con antiséptico local (solución de clorhexidina y alcohol).

Según el tipo de ensayo que se va a realizar se realiza la extracción de la placa de crecimiento junto con parte de la región diafisaria o epifisaria dependiendo del grupo experimental. Sin embargo, existen algunos puntos de la intervención comunes a todos los grupos.

La intervención se realiza con lupa binocular. Bajo iluminación directa el animal se posiciona en decúbito lateral izquierdo. Se realiza una incisión en la región radial a lo largo del eje distal del radio desde tercio medio del antebrazo hasta la articulación radiocarpiana. A continuación se realiza una disección por planos atraumática hasta exponer el radio desde su tercio medio hasta la región epifisaria. Es en este punto donde se realiza la extracción de diferentes partes del radio según el grupo.

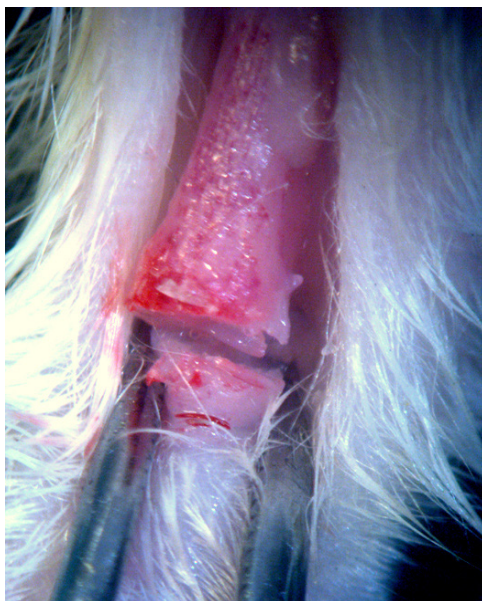
### **4.2.2.2 Grupos de ensayo del modelo.**

#### **GRUPO CONTROL**

En este grupo no se realiza intervención alguna. Se compone de 7 ratas hembras que son sacrificadas a las 12 semanas. Sus extremidades delanteras izquierdas son procesadas para el análisis histológico y servirán como referencia para comparar los distintos grupos. En este grupo se realizará una descripción de la estructura histológica de la placa de crecimiento con especial atención a la estructura del hueso subcondral supraplaca, estructura poco conocida y con aspectos no descritos en la literatura revisada.

**GRUPO 1. (Grupo D) Resección de la placa en hembras de 21 días**

Tras exponer la región distal del radio se aísla la placa de crecimiento y se realiza una resección en bloque de ésta. Posteriormente se cierra la piel con sutura multifilamento reabsorbible (Vycril ®) de 5/0 y se inmoviliza con una férula tubular de plástico en tracción del mismo modo que en el modelo de trasplante simple de placa de crecimiento (Fig 4.19).



**Figura 4.19** Placa de crecimiento del radio distal resecada.

**GRUPO E. Trasplante completo de epífisis-placa-metáfisis-diáfisis.**

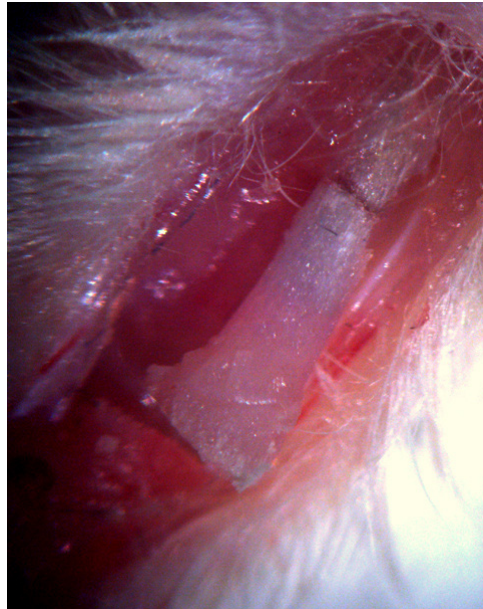
Tras exponer la extremidad distal de radio de ratas hembras de 21 días de edad se reseca el tercio medio y distal del radio incluyendo la placa de crecimiento y la epífisis. La pieza resecada se desecha. En lecho quirúrgico se interpone una gasa para realizar hemostasia y mantener el espacio necesario para la posterior implantación del injerto (Fig 4.20).

El grupo de animales donantes se compone de 8 ratas macho de 21 días de edad que son sacrificadas momentos antes de la intervención. Se realiza la extracción del radio izquierdo desde su tercio medio hasta la epífisis y bajo visión directa en lupa binocular se comprueba la integridad de las estructuras de interés y se procede a realizar el trasplante.

La fijación entre el radio injertado y el tercio proximal del radio se realiza introduciendo una aguja intramedular de un diámetro ligeramente inferior al canal

medular del radio a nivel de su tercio medio. La aguja se introduce primero en el tercio proximal del radio para después introducirla en la diáfisis del injerto.

El cierre de la piel y la inmovilización de la extremidad intervenida se realizan del mismo modo que en el resto de grupos.



**Figura 4.20** Resección de epífisis parcial, placa de crecimiento y diáfisis sin separar.

#### **GRUPO G. Trasplante de placa y hueso sin separar en fresco.**

Tras exponer la extremidad distal del radio de ratas hembra de 21 días de edad se realiza una resección del radio desde su tercio medio hasta la placa de crecimiento, conservando la epífisis. La pieza resecada se desecha. En lecho quirúrgico se interpone una gasa para realizar hemostasia y mantener el espacio necesario para la posterior implantación del injerto.

El grupo de animales donantes se compone de 15 ratas macho de 21 días de edad que son sacrificadas momentos antes de la intervención. Se realiza la extracción del radio izquierdo desde su tercio medio hasta la epífisis y bajo visión directa en lupa binocular se realiza una resección de la epífisis. La placa de crecimiento es conservada con un resto de tejido subcondral supraplaca que sirve de testigo para comprobar la procedencia del tejido en el análisis histológico.

El injerto se introduce en el lecho receptor y la fijación del radio proximal se realiza con una aguja intramedular del mismo modo que en el grupo anterior.

El cierre de la piel y la ferulización durante 1 semana de la extremidad se realiza igual que en el resto de grupos.

**GRUPO F. Trasplante de placa de crecimiento, metáfisis y diáfisis (parcial) separados ambos del mismo donante**

Tras exponer la extremidad distal del radio de ratas hembra de 21 días de edad se realiza una resección del radio desde su tercio medio hasta la placa de crecimiento, conservando la epífisis. La pieza resecada se desecha. En lecho quirúrgico se interpone una gasa para realizar hemostasia y mantener el espacio necesario para la posterior implantación del injerto (Fig 4.21).

El grupo de animales donantes se compone de 7 ratas macho de 21 días de edad que son sacrificadas momentos antes de la intervención. Se realiza la extracción del radio izquierdo desde su tercio medio hasta la epífisis y bajo visión directa en lupa binocular se realiza una resección de la epífisis. Posteriormente se separa la placa de crecimiento de la diáfisis.

El injerto se introduce en el lecho receptor y la fijación del radio proximal se realiza con una aguja intramedular del mismo modo que en el grupo anterior. El cierre de la piel y la ferulización durante 1 semana de la extremidad se realiza igual que en el resto de grupos.



**Figura 4.21** Resección de epífisis parcial, placa de crecimiento y diáfisis separados del mismo donante.

### **GRUPO C. Trasplante con distintos donantes de placa de crecimiento y diáfisis de radio distal**

Tras exponer la extremidad distal del radio de ratas hembra de 21 días de edad se realiza una resección del radio desde su tercio medio hasta la placa de crecimiento, conservando la epífisis. La pieza resecada se desecha. En lecho quirúrgico se interpone una gasa para realizar hemostasia y mantener el espacio necesario para la posterior implantación del injerto.

El grupo de animales donantes se compone de ratas macho de 15 días de edad que son sacrificadas momentos antes de la intervención. Se realiza la extracción del radio izquierdo desde su tercio medio hasta la epífisis y bajo visión directa en lupa binocular se realiza una resección de la epífisis. Después se realiza la resección de la placa de crecimiento a nivel proximal, independizándose del radio proximal. La placa de crecimiento es conservada con un resto de tejido subcondral supraplaca que sirve de testigo para comprobar la procedencia del tejido en el análisis histológico. El otro grupo de animales donantes procede de ratas macho de 1 mes de edad. A este ensayo se le denominó C-A (Fig 4.22).

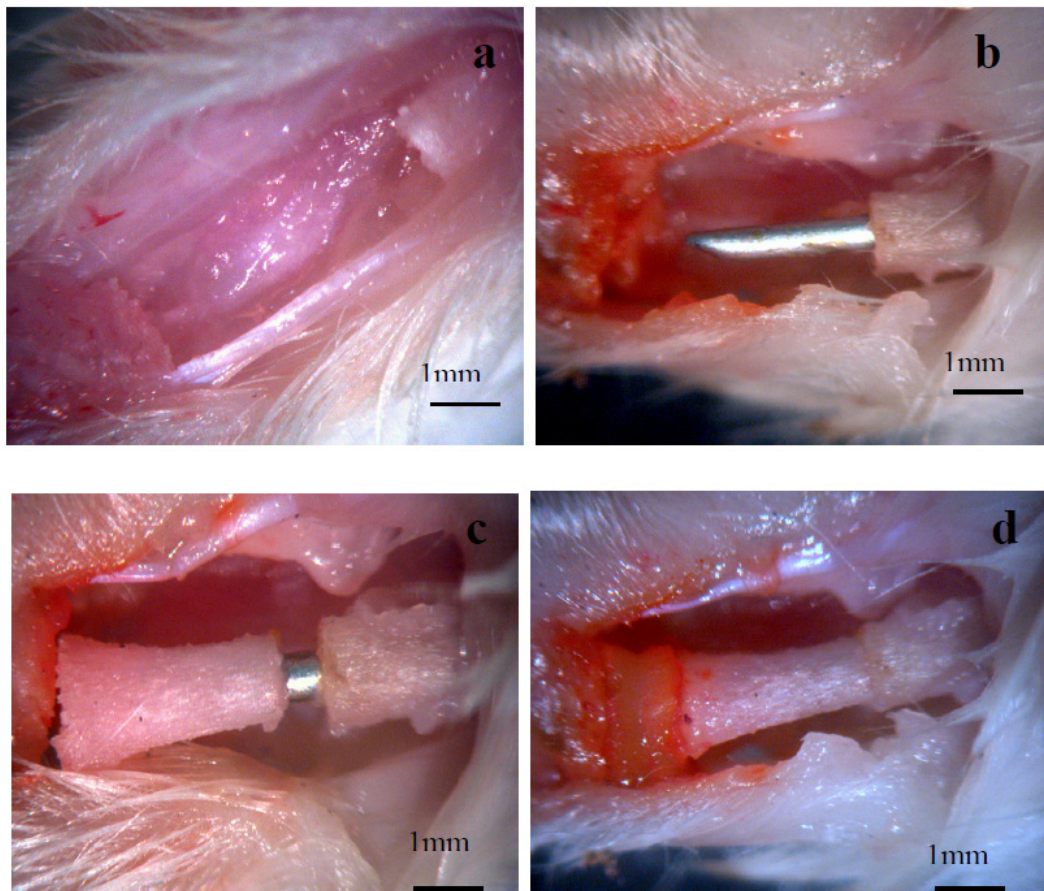
Posteriormente se realiza un injerto compuesto de radio proximal procedente de ratas de dos meses de edad y placa procedentes de ratas de 15 días de edad.

La preparación del injerto diafisario se realiza mediante la sustitución de la médula ósea del donante por la médula ósea del receptor, al igual que se practica en la clínica, en trasplantes óseos.

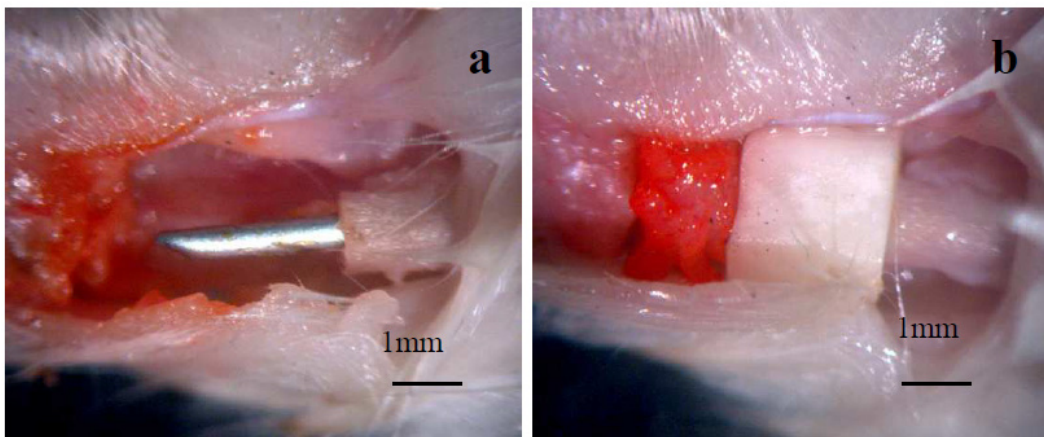
En cuatro animales se realizó un trasplante de placa de crecimiento combinado con un aloinjerto de diáfisis tibial macerada de rata, a este ensayo se le denominó Ensayo C-B (Fig 4.23).

La maceración del injerto tibial de rata se realizó según la técnica de Maatz (Maatz 1957) que consiste en la eliminación de todos los tejidos blandos del hueso mediante la aplicación de peróxido de hidrógeno y de éter.





**Figura 4.22** Ensayo C-A. a) Resección de la placa de crecimiento, y metáfisis. b) Implantación de aguja intramedular en la diáfisis del radio del receptor. c) Implantación y ensamblaje de aloinjerto de la diáfisis del radio del donante. d) Implantación de la placa de crecimiento del otro donante en el receptor.



**Figura 4.23** a) La resección de la placa de crecimiento, y metáfisis se realiza del mismo modo que en el ensayo C-A. Se realiza implantación de aguja intramedular en la diáfisis del radio del receptor. b) Implantación y ensamblaje de aloinjerto de la diáfisis de tibia de donante y de la placa de crecimiento del otro donante en el receptor (en este caso, por motivos didácticos se refuerza el color de la placa de crecimiento con eosina).

#### **4.2.2.3 Protocolo postoperatorio**

Al finalizar la intervención se administra la pauta analgésica. El animal se ubica en una jaula con una fuente de calor inferior en posición de decúbito lateral. Diariamente se realiza un control de los animales en el que se valora la severidad que pudiera causar el procedimiento quirúrgico mediante la valoración valorando estado general del animal, estado de la extremidad intervenida y estado de la férula.

En el séptimo día del postoperatorio se retira la férula que permite la libre movilidad de la extremidad.

#### **4.2.2.4 Eutanasia de los animales**

Se realiza según la técnica descrita en el apartado anterior.

#### **4.2.2.5 Análisis clínico de la extremidad**

En el estudio clínico de la extremidad se analizan los siguientes parámetros de las dos extremidades delanteras de cada animal.

Parámetros macroscópicos: aspecto general, desviación del carpo o alteraciones macroscópicas.

#### **4.2.2.6 Análisis radiográfico**

Se realiza mediante proyecciones anterior pura de antebrazo y lateral incluyendo las articulaciones del codo y radiocarpiana del mismo modo que en el modelo experimental de trasplante de placa de crecimiento.

#### **Valoración cualitativa**

La valoración cualitativa consistió en describir las características del trasplante realizado.

En primer lugar se determina si existe presencia de epífisis y si ésta es de mayor, igual o menor tamaño de lo normal. Posteriormente se valora la presencia de radiotransparencia a nivel fisario y si ésta es compatible con la

existencia de placa de crecimiento. Además se valora a qué nivel se encuentra la placa de crecimiento con respecto al cúbito, su altura respecto a éste y la inclinación de la placa. El último aspecto valorado es la presencia de puentes óseos a nivel de la placa de crecimiento.

El aloinjerto de radio es valorado según los siguientes parámetros cualitativos: la presencia o ausencia de hueso metafisodiafisario, la presencia de injerto, el tipo de injerto que se ha realizado, la edad del injerto (tanto de hueso como de placa) y si existen signos radiográficos de lisis del injerto.

Parámetros valorados en la tabla de la valoración radiográfica cualitativa del modelo experimental.

- Grupo.
- Parámetros radiológicos/Caso.
- Presencia de Epífisis (sí/no).
- Epífisis: mayor, igual o menor.
- Radiotransparencia (sí/no).
- Radiotransparencia compatible con placa (sí/no).
- Nivel de la placa con respecto al cúbito (igual/mayor/menor).
- Altura de la placa con respecto al cúbito (igual/mayor/ menor).
- Inclinación de la placa.
- Puentes óseos (sí/no).
- Presencia de hueso metafiso-diafisario (sí/no).
- Presencia de injerto (sí/no).
- Tipo de injerto.
- Lisis de injerto.
- Edad injerto de hueso.



#### **4.2.2.7 Análisis histológico**

Se realiza del mismo modo que en el apartado anterior.

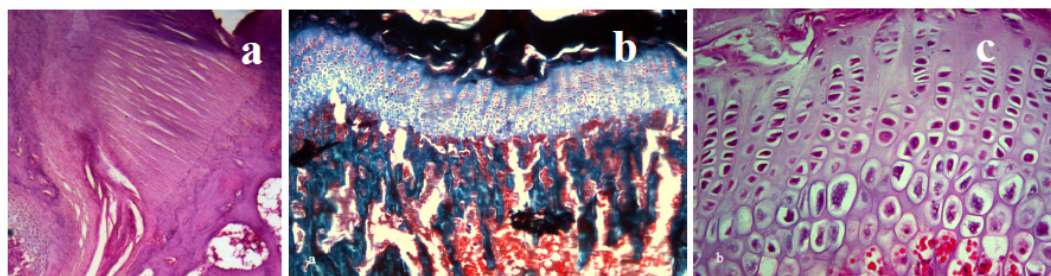
## **5 RESULTADOS**

## 5.1 GRUPO CONTROL

Se ha tomado como control de referencia la placa de crecimiento distal del radio, en ratas de 4 meses de edad, que corresponde al periodo final de los ensayos realizados. Los estudios histológicos de la placa son sobradamente conocidos en los libros de texto y hacemos referencia de algunos aspectos de utilidad en esta tesis.

La extremidad distal del radio se encuentra en íntima unión con el cubito por un potente ligamento radiocubital distal, que tiene una forma trapezoidal, donde la base mayor tiene una inserción en radio y la base menor en cubito (Fig. 5.1a).

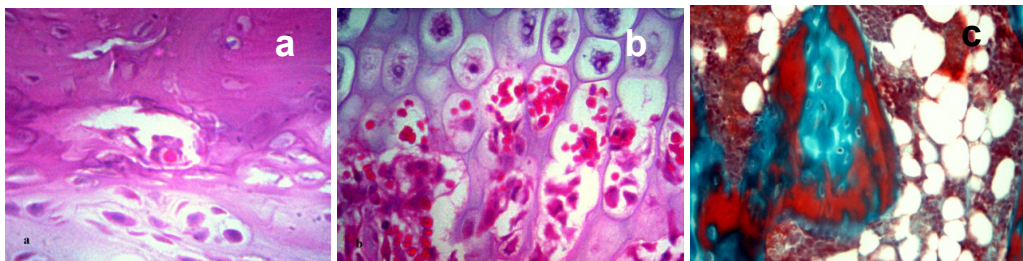
La epífisis tiene una constitución poliédrica rectangular con un borde articular que se corresponde con el cartílago articular, y un borde metafisario que corresponde la placa de crecimiento, y dos bordes laterales. En la parte superior del borde lateral interno, que se corresponde con cúbito, se inserta el ligamento radiocubital distal (Fig. 5.1a). Ambos bordes están cubiertos por el pericondrio.



**Figura 5.1** (Grupo control) a) Ligamento radio-cubital distal (H-E 4x). b) Placa de crecimiento (Tricrómico de Masson 4x). c) Placa de crecimiento (H-E 10x).

La placa de crecimiento está formada por cartílago hialino constituida por células, condrocitos, con una distribución anisotrópica, distribuidos en grupos que forman columnas (Fig. 5.1b y 5.1c). A su vez, la distribución de los condrocitos configuran tres zonas: zona germinativa, zona proliferativa y zona hipertrófica. En el borde condrometafisario de la placa de crecimiento se inician los procesos de osificación endocondral.

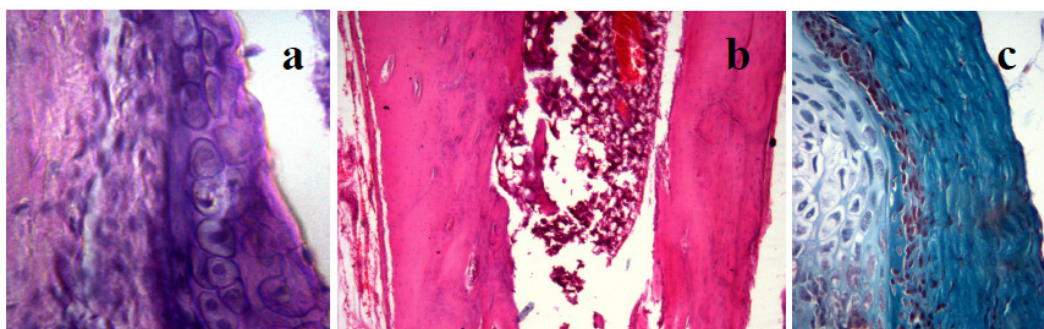
La placa se encuentra entre tres sistemas vasculares: uno superior, procedente de la arteria epifisaria que va a irrigar a la zona proliferativa (Fig 5.2a); otro inferior, por vasos que proceden de la arteria metafisaria, responsable de la invasión vascular de las lagunas de los condrocitos. (Fig 5.2b); y, un tercer sistema lateral, por vasos procedentes del anillo pericondral (a su vez procedentes de vasos epifisarios).



**Figura 5.2** (Grupo control) a) Vaso sobre la zona germinativa (H-E 40x). b) Vasos en la zona hipertrófica (H-E 40x). c) Trabéculas metafisarias (Tricrómico de Masson 10x).

En el borde condro-metafisario de la placa se inicia la formación de trabéculas primarias y secundarias. Estas últimas se unen, aumenta de tamaño y se forman las trabéculas de la diáfisis. En la rata, las trabéculas secundarias y algunas trabéculas de la diáfisis suelen conservar una zona central de tejido condral (Fig. 5.2c).

En la cortical metafisaria ocasionalmente se han observado condrocitos en el trayecto próximo a la cortical (Fig 5.3a).



**Figura 5.3** (Grupo control) a) Condrocitos situados en el borde interno de la cortical metafisaria (H-E 20x). b) Cortical diafisaria. Formado por hueso lamelar (H-E 4x). c) Anillo pericondral control (Tricrómico de Masson 20x).

La cortical de la diáfisis está formada principalmente por hueso lamelar, en el que se observan ocasionalmente hueso inmaduro en la región central de la cortical; en la cortical se observan trayectos vasculares (Fig. 5.3b).

En ambos bordes de la placa se aprecia el anillo pericondral, constituido por dos zonas: el surco de Ranvier en el que se encuentra un grupo de células de menor densidad numérica; y, la zona de Lacroix en la que se describen osteoblastos junto a la barra ósea que forman, y un conjunto de células, fibroblastos. Ambas zonas están cubiertas por un tejido fibro-conjuntivo que las aísla del pericondrio de la epífisis y del periostio de la diáfisis (Fig. 5.3c).

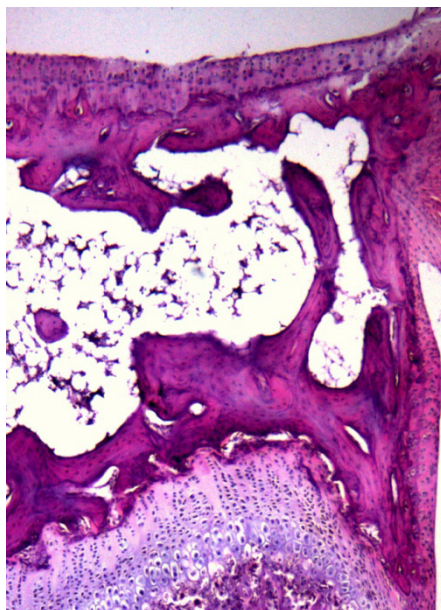
### **5.1.1 Resumen Grupo Control**

Se describen las características normales de la placa de crecimiento del radio distal. Se describen las características normales del hueso supra-placa en la placa de crecimiento normal, en la placa de crecimiento que ha sido sometida a alteraciones mecánicas y en la placa de crecimiento trasplantada.

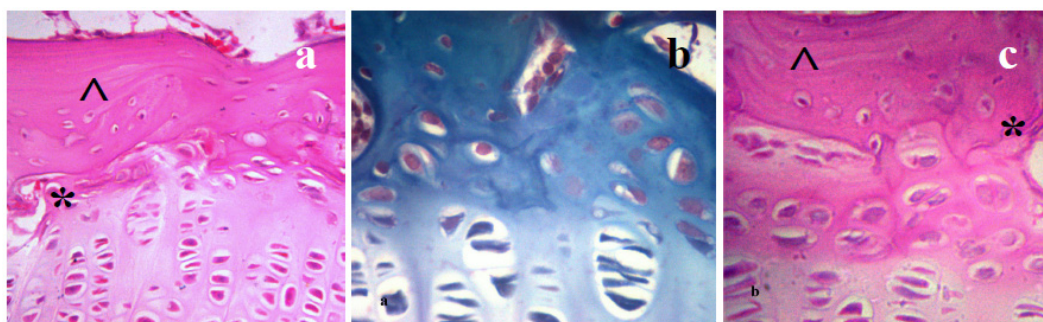
## **5.2 HUESO SUPRA-PLACA**

### **5.2.1 Hueso supra-placa, en placa de crecimiento normal**

Sobre el borde de la zona germinativa de la placa de crecimiento se encuentra una estructura ósea de la epífisis que la cubre en toda su extensión y que ha sido denominada anteriormente en nuestro laboratorio hueso supra-placa (Delgado-Martos, 2010) (Fig. 5.4, Fig. 5.5 a, b y c). Este hueso es una estructura ósea que se encuentra en la epífisis, formando parte de la misma, y poco definida en la actualidad. El hueso supra-placa está formado por dos tipos de huesos: Tipo I hueso inmaduro próximo a la zona germinativa de la placa de crecimiento y Tipo II hueso lamelar. Si se toma como referencia la altura total del hueso supra-placa en las edades que trabajamos (4 meses), con una altura media total de 85.4  $\mu\text{m}$ , el hueso tipo I tiene una altura media de 29.34  $\mu\text{m}$  equivalente a un 34% de la altura total del hueso supra-placa; y el tipo II tiene una altura media de 56.06  $\mu\text{m}$  equivalente al 66% de la altura media del hueso supra-placa. (Fig. 5.5a). En algunas zonas de su trayecto el hueso supra-placa esta en íntimo contacto con la placa de crecimiento; en otras zonas se observa una solución de continuidad, lugar por donde se dirigen los vasos a la placa de crecimiento.



**Figura 5.4** (Grupo control) Epífisis y hueso supra-placa. Región distal del radio (H-E 4x).

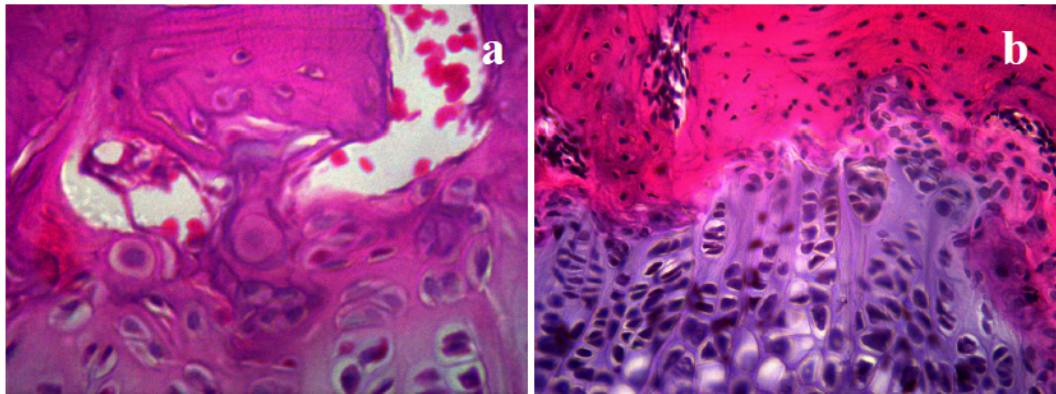


**Figura 5.5** (Grupo control) Hueso supra-placa a) (H-E 20x). b) (Tricrómico de Masson 40x). c) (H-E 40x). \* hueso inmaduro; ^ hueso lamelar.

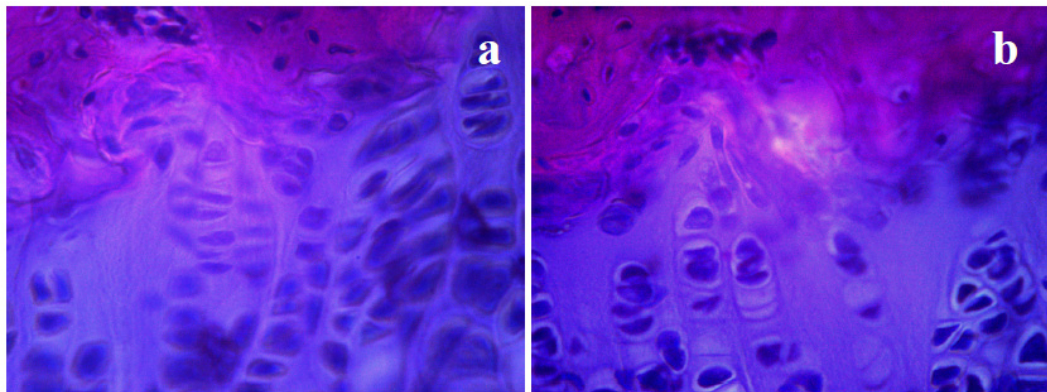
Entre la zona superior del germinativo y la zona inferior del hueso supra-placa, en las regiones en las que no se aprecia solución de continuidad de ambas estructura se encuentra un patrón de tejido de osificación en el que participan células con un carácter fenotípico similar a las de la zona del germinativo (Fig. 5. 5b y c). En todos los casos ha llamado la atención la presencia en el hueso inmaduro de células, con núcleo redondo, con mayor relación de núcleo/citoplasma, dentro de una gran laguna de aspecto redondeada. Estas células y lagunas son de morfología diferentes a las células y lagunas de las estructuras óseas vecinas. En algunas preparaciones se observan digitaciones tisulares entre la placa de crecimiento y la zona de hueso inmaduro del hueso supra-placa (Fig. 5.6 a). En otras preparaciones se observan prolongaciones de grupos de células, o incluso de columnas de células del



germinativo, hacia la zona de hueso inmaduro del hueso supra-placa (Fig. 5.6b; Fig. 5.7 a y b).



**Figura 5.6** (Grupo control) a) Digitaciones tisulares de hueso inmaduro en el hueso supra-placa (H-E 40x). b) Prolongaciones de grupos de células de la zona del germinativo (H-E 20x).

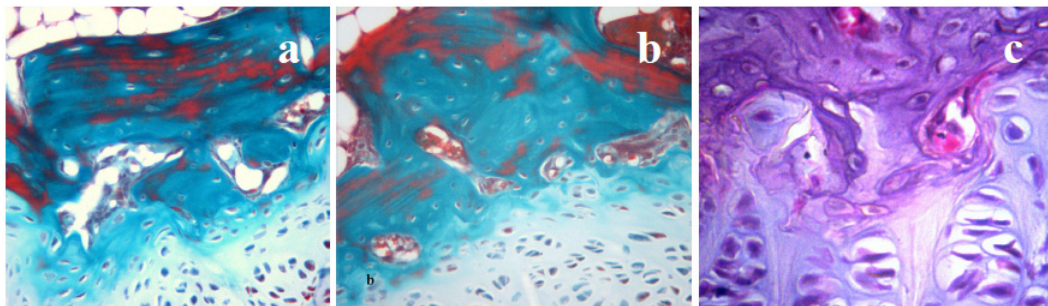


**Figura 5.7** (Grupo control) a y b) Distintos tipos de agrupaciones de las prolongaciones de grupos de células de la zona del germinativo (H-E 40x).

### 5.2.2 Hueso supra-placa en placa de crecimiento con alteración mecánica (cúbito).

Se analiza el cúbito, que ha sido sometido a fuerzas mecánicas no habituales, entre ellas por la tracción del ligamento radiocubital, consecuencia de fallo de los trasplantes de placa de crecimiento en el radio. En el hueso supra-placa se altera la estructura anatómica citada previamente en el hueso control. El hueso supra-placa aparece con una forma abigarrada, en algunos casos con un predominio de hueso inmaduro de tipo I (Fig. 5.8 a y b). En estas placas de crecimiento del cúbito, en el hueso supra-placa se encuentran células de la zona del germinativo próximas al hueso supra-placa de la placa de crecimiento

distal del cúbito que alteran su patrón del fenotipo. En ocasiones se rompe la unión del hueso supra-placa con la zona germinativa por necrosis tisular, en la que áreas condrales quedan incluidas en zonas de hueso supra-placa y zonas de hueso inmaduro en la zona germinativa, formándose una amalgama de tejido condral y óseo (Fig.5.8 c).

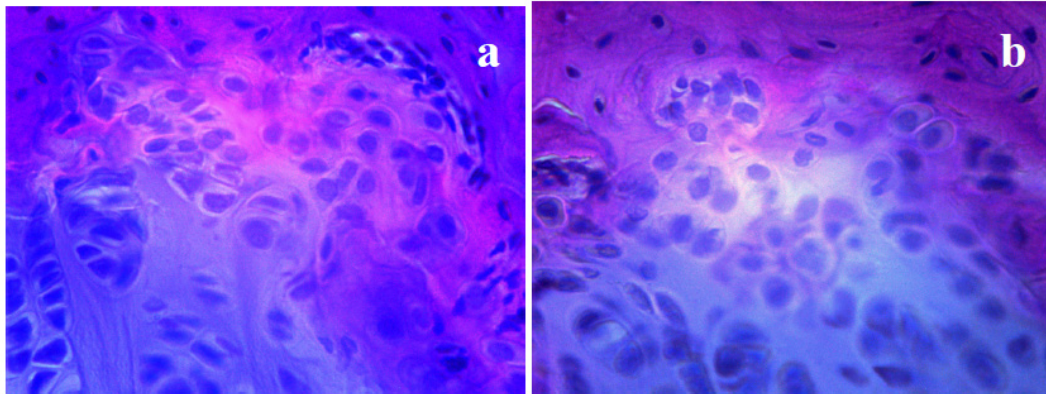


**Figura 5.8** (Grupo control) a) Hueso supra-placa del cúbito (Tricrómico de Masson 20x). b) Hueso supraplaca del cúbito (Tricrómico de Masson 20x). c) Necrosis tisular que implica placa de crecimiento y hueso supra-placa inmaduro (H-E 40x).

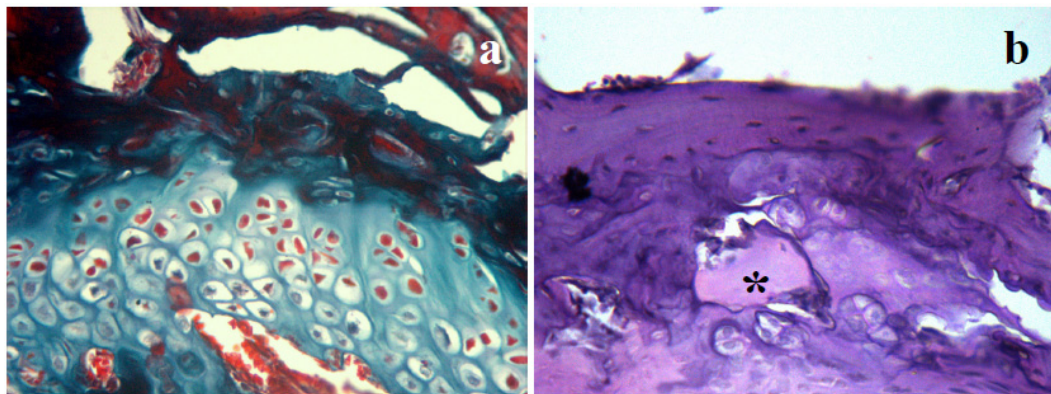
### 5.2.3 Hueso supra-placa en placa de crecimiento trasplantadas

En algunos casos se ha observado en placas bien conservadas la existencia de una imagen, en “suelta de de globos”, de células del germinativo en la zona de hueso inmaduro del hueso supra-placa (Fig.5.9 a y b). En otras ocasiones se ha observado una discontinuidad completa entre el hueso supra-placa y la placa de crecimiento, así como la presencia un tejido en el que se incluyen células de habito condral y de osteocitos ocupando esta zona (Fig. 5.10 a). En otros casos la discontinuidad ha sido incompleta, observando parte del hueso inmaduro, así como el espacio entre el hueso supra-placa y la placa es ocupado por un tejido en el que se incluyen células de hábito condral (Fig. 5.10b).





**Figura 5.9** Figura 5.9. (Grupo control) a y b) Imagen de condrocitos en “suelta de globos” en el hueso supra-placa (H-E 40x).



**Figura 5.10** (Grupo control) a) Zona del hueso supra-placa donde se observa tejido en el que se incluyen células de habito condral y de osteocitos (Tricrómico de Masson 20x). b) Desestructuración de hueso inmaduro de hueso supra-placa con necrosis parcial de la zona germinativa (H-E 20x). \* Área celular de la zona germinativa.

### 5.3 RESULTADOS DEL GRUPO DE RESECCIÓN DE LA PLACA DE CRECIMIENTO (GRUPO D)

#### 5.3.1 Estudio clínico y radiológico (Fig. 5.11):

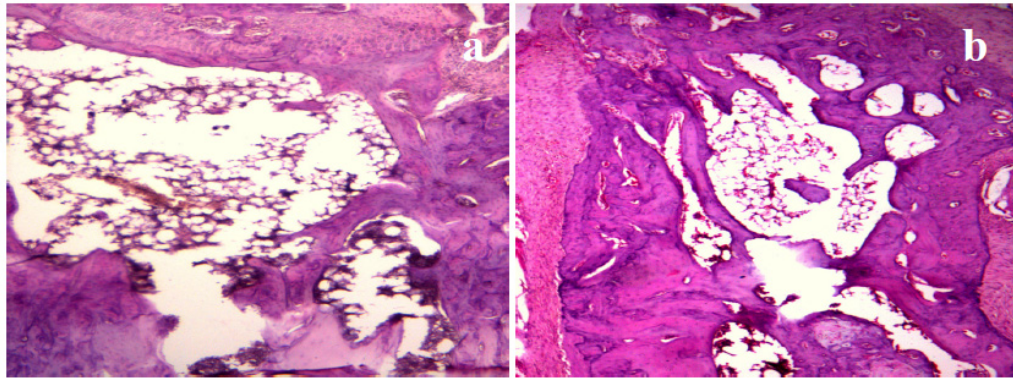
En el radio en el que se ha resecado la placa de crecimiento se observa la presencia de epífisis en un 85% de los casos. En la región correspondiente a la placa de crecimiento se observa una zona radiotransparente, que no corresponde a la presencia de placa de crecimiento. En el 15 % de los casos restantes, se observa un muñón óseo en la región distal del radio. En un 42% de los casos existe una sinóstosis radiocubital distal.



**Figura 5.11** Imagen radiológica de extremidad anterior, con placa de radio resecada. (grupo D). Se observa la presencia de epífisis y una zona radiotransparente en la región fisaria que no corresponde a la placa de crecimiento.

### 5.3.2 Estudio histológico

En este ensayo durante la técnica quirúrgica de resección de la placa proximal del radio no se lesionan los vasos epifisarios. En este grupo se ha realizado una resección completa de la placa de crecimiento. Tras la finalización del ensayo, en ningún caso se ha observado placa de crecimiento, o restos de la misma, o una estructura condral que recuerde a ella (Fig. 5.12 a y b). El radio pierde su relieve anatómico. Las epífisis se han encontrado todas de mayor tamaño, con forma de trapecio invertido, correspondiendo la base mayor a la superficie articular del radio. La superficie del radio pierde su eje normal con respecto a la diáfisis del radio. En la epífisis disminuyen las trabéculas óseas, así como la médula ósea que llega casi a desaparecer, en su lugar se aprecian numerosos adipocitos. En las trabéculas óseas se aprecian escasos ribetes de osteoblastos. En algunos casos se han observado trabéculas con células condrales en su interior. (Fig. 5.12 b). En las zonas del pericondrio y periostio del radio se observa abundante tejido fibroso.



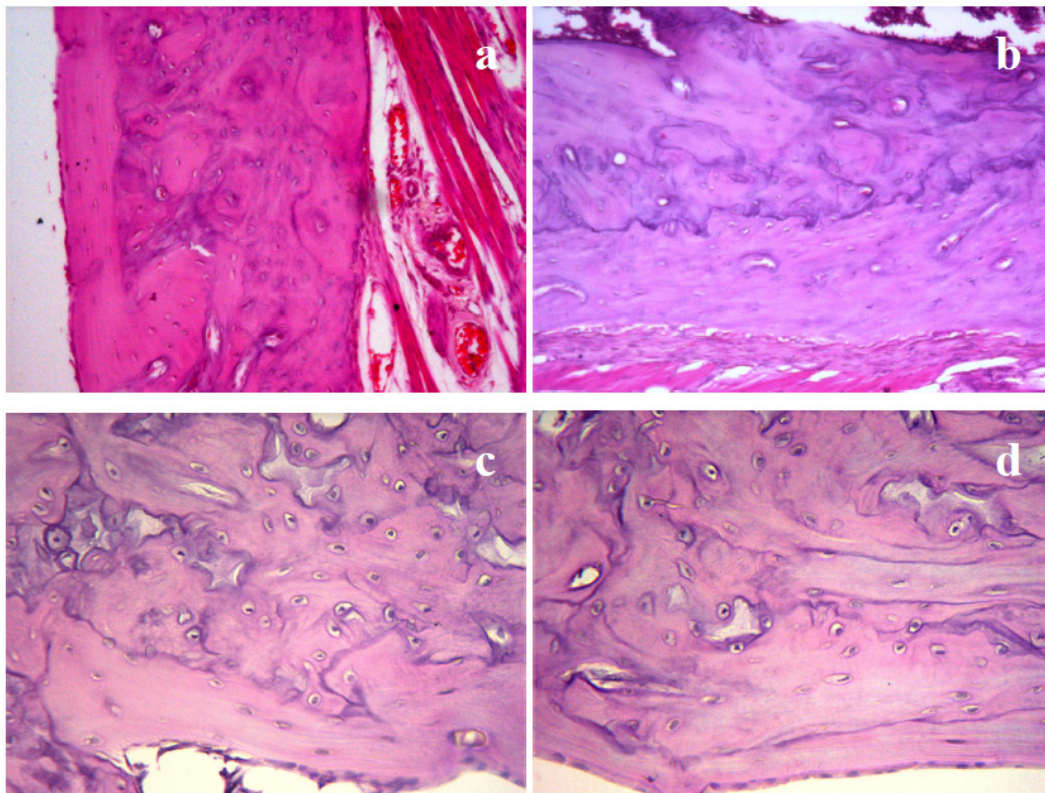
**Figura 5.12** (Grupo D) a) Epífisis sin placa de crecimiento H-E 4x. b) Epífisis sin placa de crecimiento. Se observa el aumento de espesor de las corticales en ambos bordes laterales de la epífisis (H-E 4x).

En este ensayo no se observa hueso supra placa; sin embargo en algunos casos se observa una lengüeta ósea que “cae” de la epífisis a la zona de la metáfisis; en estos últimos casos se aprecia íntima unión ósea entre la lengüeta ósea y la cortical.

En epífisis, metáfisis y diáfisis el patrón de médula ósea es escaso, y abundan adipocitos.

Cortical del radio. Se han identificado 4 tipos de lesiones. En los casos iniciales, en la zona interna de la cortical del radio se aprecian irregularidades óseas, que corresponde a neoformación de hueso, cuyas osteonas tienen un eje perpendicular a la cortical (Fig. 5.13 a), respetando en el inicio, en mayor o menor grado, el hueso lamelar, que también se ve afectado (Fig. 5.13b). En casos más avanzados la lesión abarca casi todo el área de la cortical (Fig. 5.13c); llegando en ocasiones a incluir hueso lamelar en su interior (Fig. 5.13d). El análisis de la respuesta de la cortical al insulto óseo se analizará en el apartado de resultados del grupo G (resección de placa de crecimiento).





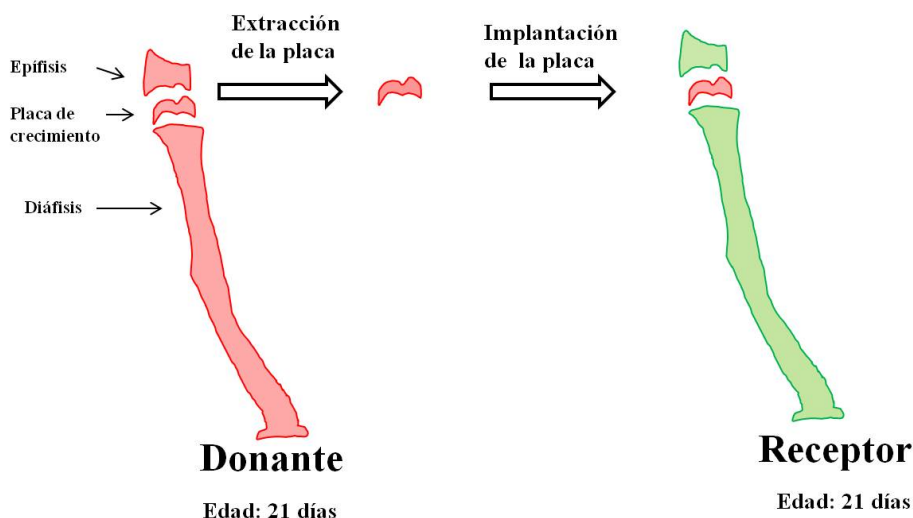
**Figura 5.13** (grupo D) a) Cortical del radio. Formación de nuevas osteonas región interna de la cortical (H-E 40x). b) La estructura lamelar de la cortical se observa invadida por la formación de nuevas osteonas (H-E 10x). c) La lesión afecta a casi la totalidad del hueso lamelar de la cortical (H-E 20x). d) Hueso lamelar queda incluido en la cortical por la formación de nuevo hueso (H-E 20x).

### **5.3.3 Resumen del grupo de resección de la placa de crecimiento (Grupo D)**

En este grupo se observan alteraciones de la arquitectura normal del radio, de la epífisis y de la diáfisis. Se observan dos tipos de epífisis: en unos casos la epífisis se une a la región metafiso diafisaria formando un muñón óseo. En otros casos, se observa la epífisis seguida de la diáfisis, sin solución de continuidad. No se observa la presencia de hueso supra-placa.

## 5.4 OBJETIVO 1. ALOTRASPLANTE SIMPLE DE PLACA DE CRECIMIENTO

### 5.4.1 Trasplante en fresco de 6 semanas de evolución (Esquema 1)



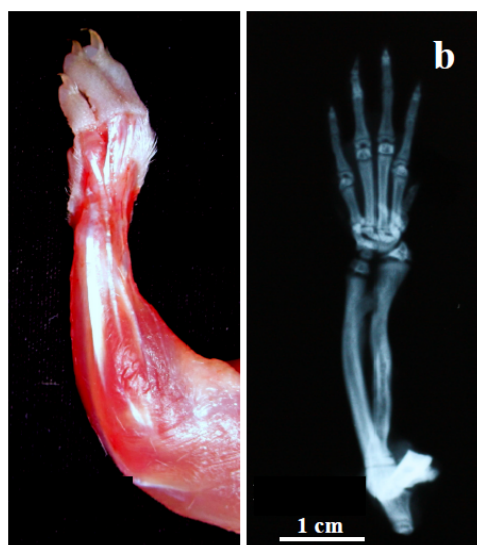
**Esquema 1.** Esquema de la intervención trasplante en fresco ortotópico avascular de placa de crecimiento de radio distal.

#### 5.4.1.1 Estudio clínico y radiológico

En el examen macroscópico de las extremidades se aprecia hipotrofia muscular en las extremidades intervenidas (Fig 5.14a).

El examen clínico de las extremidades intervenidas revela disminución de la flexión volar de la muñeca, así como limitación de la pronación y de la supinación significativas. El resto de los parámetros no presentan diferencias respecto a los controles (Tabla I).

El examen radiológico muestra una disminución significativa de la longitud del cúbito y del radio, así como de la longitud del eje proximal del radio. En el resto de parámetros medidos no se observan diferencias significativas (Fig 5.14b y Tabla II).



**Figura 5.14** a) Extremidad anterior perteneciente al grupo trasplante de placa de crecimiento en fresco 6 semanas de evolución. b) Imagen radiológica, proyección anteroposterior del antebrazo, perteneciente al grupo trasplante en fresco 6 semanas.

**Tabla I.** Comparación de los parámetros clínicos entre la extremidad trasplantada y la extremidad control en el grupo de trasplante en fresco de 6 semanas de evolución (La valoración radiológica se ha realizado de forma cualitativa y cuantitativa del modo descrito en el apartado de métodos).

<b>Trasplante fresco 6 semanas (n=8)</b>	<b>Articulación trasplantada</b> (media $\pm$ DE)	<b>Articulación control</b> (media $\pm$ DE)	<b>p</b>
<b>Extensión Carpo</b> (grados)	71,87 $\pm$ 25,63	90,00 $\pm$ 0,00	0,09
<b>Flexión Carpo</b> (grados)	49,37 $\pm$ 42,63	121,88 $\pm$ 22,67	0,00*
<b>Supinación</b> (grados)	-4,38 $\pm$ 9,43	18,13 $\pm$ 22,03	0,02*
<b>Pronación</b> (grados)	13,75 $\pm$ 11,88	29,38 $\pm$ 11,78	0,02*
<b>Extensión Codo</b> (grados)	-9,38 $\pm$ 1,77	-10,00 $\pm$ 2,67	0,6
<b>Flexión Codo</b> (grados)	116,25 $\pm$ 6,94	121,25 $\pm$ 4,43	0,1
<b>Diámetro antebrazo</b> (mm)	2,03 $\pm$ 0,26	1,96 $\pm$ 0,29	0,6
<b>Diámetro brazo</b> (mm)	4,14 $\pm$ 0,45	4,21 $\pm$ 0,55	0,7

Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$

**Tabla II.** Comparación de los parámetros radiológicos entre la extremidad trasplantada y la extremidad control en el grupo de trasplante en fresco de 6 semanas de evolución

<b>Trasplante fresco 6 semanas (n=8)</b>	<b>Articulación trasplantada (media ± DE)</b>	<b>Articulación control (media ± DE)</b>	<b>p</b>
<b>longitud cúbito (mm)</b>	23,40±1,44	27,37±1,16	0,00*
<b>Longitud radio (mm)</b>	16,92±2,14	20,68±0,95	0,01*
<b>Longitud eje proximal radio (mm)</b>	6,58±0,84	9,16±1,08	0,00*
<b>Longitud eje distal radio (mm)</b>	13,75 ±1,58	11,71±0,89	0,06
<b>Longitud fisis radial externa (mm)</b>	0,50±0,27	0,48±0,09	0,83
<b>Longitud fisis radial media (mm)</b>	0,31±0,17	0,34±0,09	0,6
<b>Longitud fisis radial interna (mm)</b>	0,39±0,27	0,42±0,08	0,7
<b>Longitud epífisis radial externa (mm)</b>	1,86± 0,89	1,52±0,14	0,32
<b>Longitud epífisis radial interna (mm)</b>	1,31±1,02	0,95±0,08	0,34
<b>Anchura metáfisis radial (mm)</b>	1,97±0,54	1,78±0,13	0,37
<b>anchura fisis proximal (mm)</b>	2,03±0,53	1,89±0,10	0,46
<b>anchura fisis distal (mm)</b>	2,09±0,60	2,00±0,11	0,67
<b>Anchura epífisis media (mm)</b>	1,99±0,42	1,94±0,08	0,7
<b>Ángulo metafisario(grados)</b>	24,03±15,22	18,33±2,26	0,3
<b>Ángulo diáfisis/epífisis (grados)</b>	17,80±10,46	12,38±2,95	0,2
<b>Arco radial máximo (grados)</b>	215,61±46,28	254,82±55,82	0,14
<b>Inclinación radial (grados)</b>	19,36±8,88	22,15±2,77	0,41
<b>Inclinación volar (grados)</b>	10,91±14,07	18,01±8,51	0,24

Test de la t de student.\* Significación estadística para p<0,05

#### 5.4.1.2 Estudio histológico

En el examen de las placas de crecimiento se observan varios tipos de respuestas.

Destrucción completa de la placa de crecimiento, quedando restos parciales (Fig. 5.15 a), o bien restos con puentes fibrosos (Fig. 5.15 b).

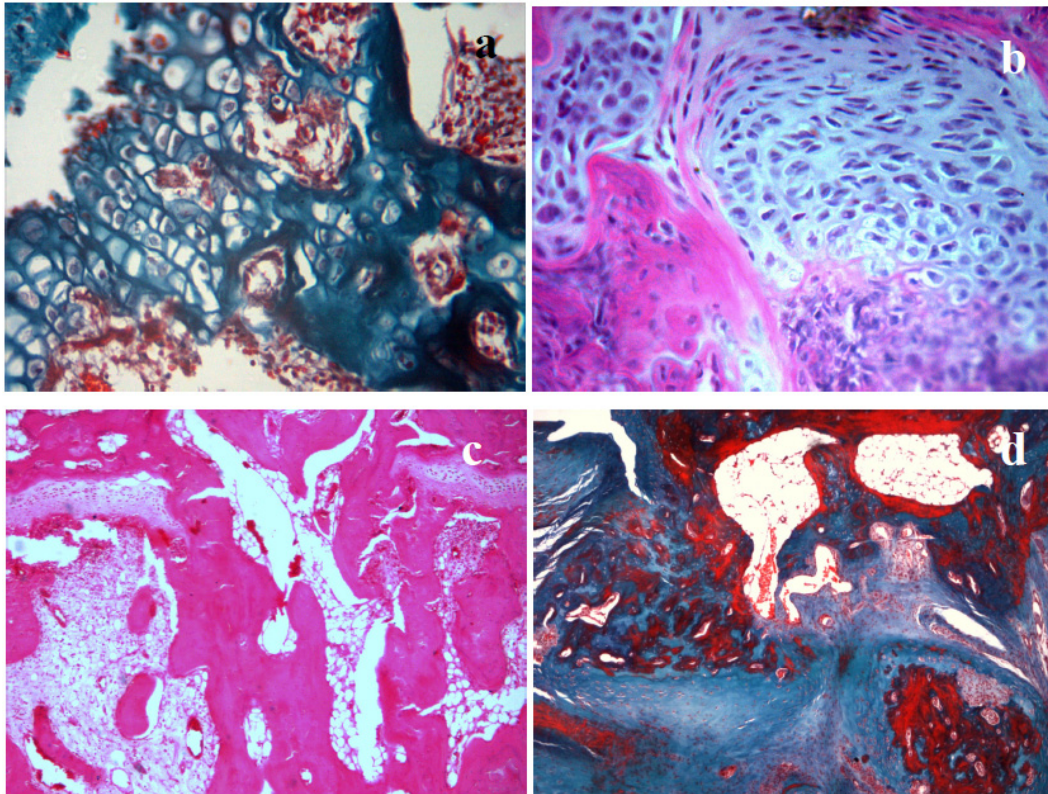
Persistencia de la placa con puentes óseos (Fig. 5.15c); o, placas completamente destruidas con puentes fibrosos (Fig. 5.15d).

Presencia de placas de crecimiento con necrosis celular, ausencia de metáfisis y abundante tejido adiposo en médula.

Placas con apariencia normal, en las que no se observan zona germinativa (Fig. 5.16a). Placas de crecimiento con apariencia normal (Fig. 5.16b) en la que se observa aumento de la zona proliferativa más predominante en la región lateral de la placa, con un puente central fibroso (Fig. 5.16c). En este mismo caso se observa la presencia de vasos con hematíes en el borde hipertrófico metafisario, con un componente de células de respuesta inflamatoria (Fig. 5.16d).

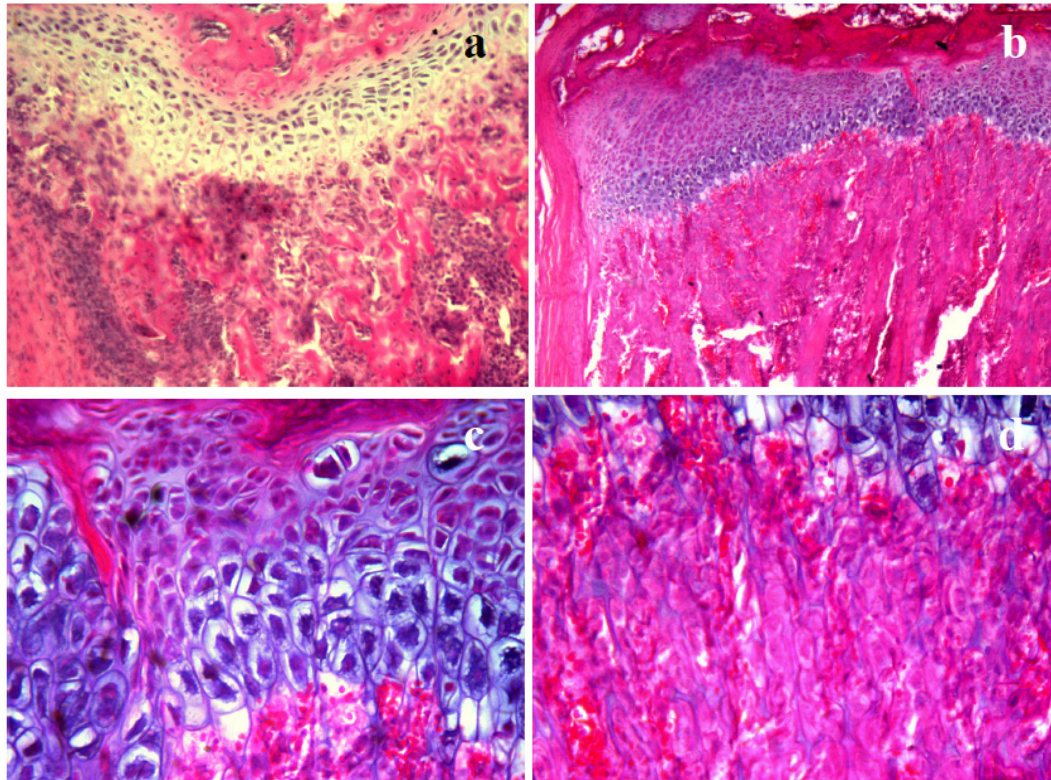


En este ensayo se ha observado un caso con la placa de crecimiento aumentada de tamaño, de forma predominante por aumento de células en la zona hipertrófica. (Fig. 5.17a). En la zona del germinativo se apreciaron escasas células; la zona proliferativa era irregular con escasas columnas y células (Fig. 5.17b). En este caso no se forman trabéculas.

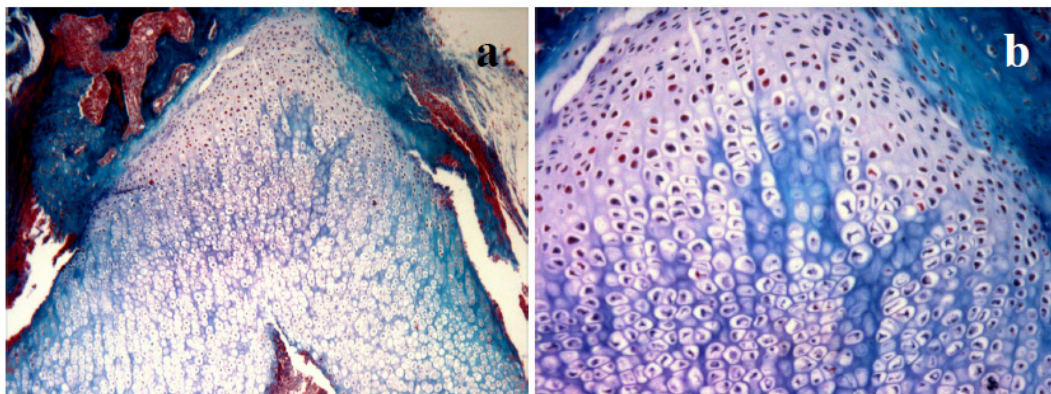


**Figura 5.15** (Fresco 6 semanas) a) Se observan restos parciales de la placa de crecimiento (Tricrómico de Masson 20x). b) Puente fibroso en la región de la placa reseçada (H-E 20x). c) Se observa persistencia de restos de placa con puentes óseos (H-E 10x). d) Destrucción de placa con puentes fibrosos (H-E 10x).



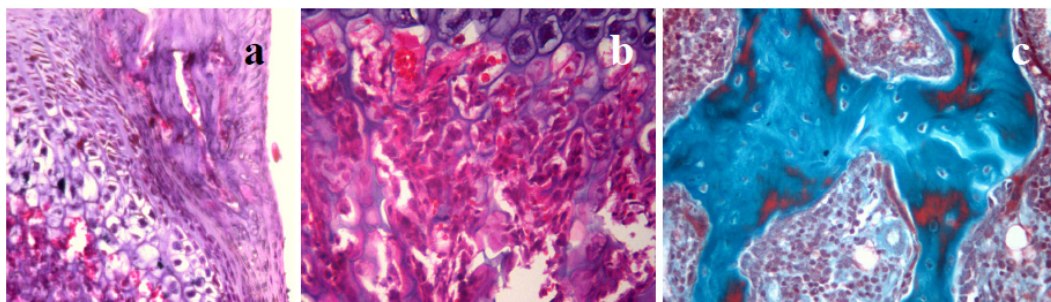


**Figura 5.16** (Fresco 6 semanas) a) Placa de crecimiento (H-E 20x). b) Placa de crecimiento con aumento de la zona proliferativa junto con un puente central fibroso (H-E 4x). c) Puente fibroso (H-E 20x). d) Borde hipertrófico metafisario, con un componente de células de respuesta inflamatoria (H-E 20x).



**Figura 5.17** (Fresco 6 semanas) a) Placa de crecimiento expandida, con predominio de la zona hipertrófica (H-E 4x). b) Detalle de la anterior, se observa zona germinativa con escasas células; la zona proliferativa irregular con escasas columnas y células; en la zona hipertrófica se observan condrocitos sin núcleos (H-E 10x).

El anillo pericondral. En este grupo de ensayo, en los casos en que se ha observado, no se identifican las zonas del anillo; y lo que se observa es una fibrosis del mismo (Fig. 5.18 a).



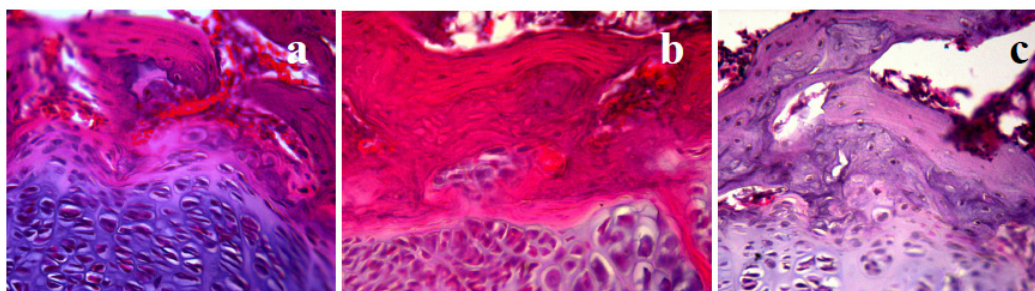
**Figura 5.18** (Fresco 6 semanas) a) Fibrosis del anillo pericondral (H-E 10x). b) Trabéculas óseas metafisarias con escaso componente óseo (H-E 20x). c) Trabéculas con ribetes de osteoblastos. Trabéculas metafisarias con poco predominio óseo (Tricrómico de Masson 20x).

Las trabéculas óseas de la metáfisis (Fig. 5.18 b) y diáfisis (Fig. 5.18c) tienen escaso componente óseo, a pesar de que en algunas se observan ribetes de osteoblastos.

### Hueso supra-placa.

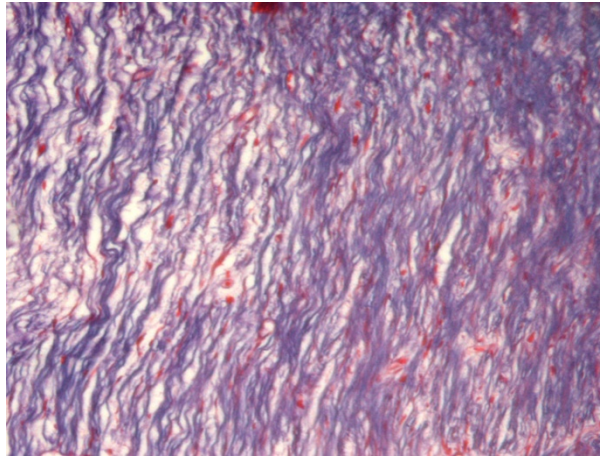
El hueso supra-placa, aunque no se han aplicado técnicas para diferenciar hueso del lecho y hueso formado por el injerto, se observa desestructurado, con una arquitectura discontinua, a gran distancia de la zona germinativa de la placa, con interposición de un tejido amorfo irregular (Fig. 5.19 a, b y c); en las que se observa hueso lamelar alejado de la placa y la interposición de un tejido compatible con hueso inmaduro.

En la médula ósea predomina un tejido con abundantes células de carácter inflamatorio, con nula presencia de tejido hematopoyético. En algunos casos, extremos, se observa la presencia abundante de tejido fibrilar de colágeno (Fig. 5.20).



**Figura 5.19** (Fresco 6 semanas) a) Hueso supra-placa (H-E 20x). b) Hueso supra-placa discontinuo con predominio en el número de vasos H-E 20x. c) Hueso supra-placa con discontinuidad en el hueso lamelar y hueso inmaduro (H-E 20x).





**Figura 5.20** (Fresco 6 semanas) a) Tejido fibrilar de colágeno en la médula ósea (Tricrómico de Masson 10x).

#### **5.4.1.3 Resumen del grupo trasplante en fresco de 6 semanas de evolución**

En este grupo se observan alteraciones macroscópicas y radiológicas en comparación con el grupo control. En las placas de crecimiento se observan varios tipos de respuestas: destrucción completa de la placa, persistencia de la placa con puentes óseos, presencia de placas de crecimiento con necrosis celular y placas de apariencia normal. El hueso supra-placa se encuentra desestructurado.

#### **5.4.2 Trasplante en fresco de de 12 semanas de evolución**

##### **5.4.2.1 Estudio clínico y radiológico**

En el examen macroscópico de las extremidades se aprecia desviaciones hacia radial de las manos en las extremidades intervenidas, configurando, en algunos casos, manos zambas de carácter leve (Fig 5.21 a).

El examen clínico de las extremidades intervenidas revela una disminución de la flexión volar de la muñeca, así como una limitación de la pronación y de la supinación significativas. El resto de los parámetros no presentan diferencias significativas respecto a los controles (Fig 5.21 b y Tabla III).

El examen radiológico muestra una disminución significativa de la longitud del cúbito y del radio, de la longitud de los ejes proximal y distal del radio, así como de la longitud de la fisis radial externa. En el resto de parámetros medidos no se observan diferencias significativas (Tabla IV).



**Figura 5.21** a) Extremidad anterior perteneciente al grupo trasplante de placa de crecimiento en fresco 12 semanas de evolución. b) Imagen radiológica, proyección anteroposterior del antebrazo, perteneciente al grupo trasplante en fresco 12 semanas.

**Tabla III.** Comparación de los parámetros clínicos entre la extremidad trasplantada y la extremidad control en el grupo de trasplante en fresco de 12 semanas de evolución.

<b>Trasplante fresco 12 semanas (n=13)</b>	<b>Articulación trasplantada (media ± DE)</b>	<b>Articulación control (media ± DE)</b>	<b>p</b>
<b>Extensión Carpo (grados)</b>	85,38±10,50	97,69±10,13	0,06
<b>Flexión Carpo (grados)</b>	86,15±30,76	116,15±7,68	0,04*
<b>Supinación (grados)</b>	3,69±2,98	13,85±6,50	0,00*
<b>Pronación (grados)</b>	6,38±5,24	14,62±6,60	0,02*
<b>Extensión Codo (grados)</b>	-5,00±0,00	-5,00±0,00	**
<b>Flexión Codo (grados)</b>	120,00±0,00	120,00±0,00	**
<b>Diámetro antebrazo (mm)</b>	2,16±0,25	2,05±0,30	0,29
<b>Diámetro brazo (mm)</b>	4,40±0,27	4,54±0,13	0,11

Test de la t de student.\* Significación estadística para  $p < 0,05$ . \*\*No puede calcularse T porque las desviaciones típicas de ambos grupos son 0.

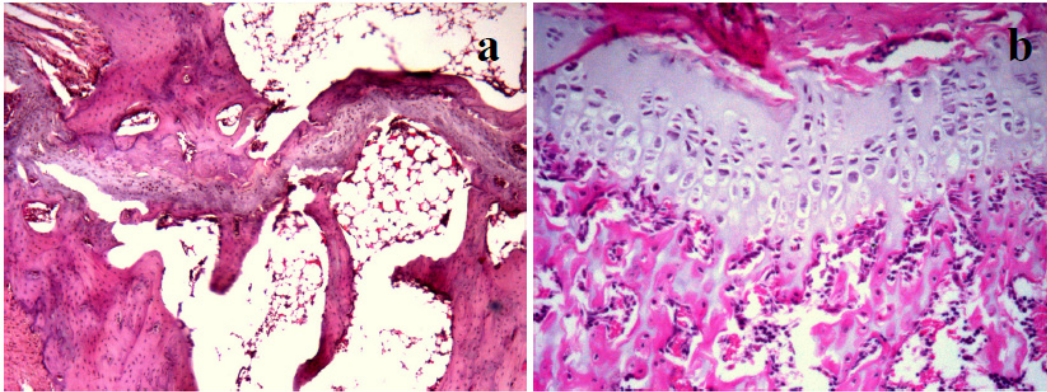
**Tabla IV.** Comparación de los parámetros radiológicos entre la extremidad trasplantada y la extremidad control en el grupo de trasplante en fresco de 12 semanas de evolución.

<b>Trasplante fresco 12 semanas (n=13)</b>	<b>Articulación trasplantada (media ± DE)</b>	<b>Articulación control (media ± DE)</b>	<b>p</b>
<b>longitud cúbito (mm)</b>	26,16±2,20	30,44±1,29	0,00*
<b>Longitud radio (mm)</b>	19,62±2,94	23,57±0,49	0,00*
<b>Longitud eje proximal radio (mm)</b>	7,87±1,54	9,74±0,89	0,01*
<b>Longitud eje distal radio (mm)</b>	11,91±2,74	13,70±0,91	0,03*
<b>Longitud fisis radial externa (mm)</b>	0,26±0,13	0,39±0,09	0,07
<b>Longitud fisis radial media (mm)</b>	0,30±0,20	0,30±0,08	1
<b>Longitud fisis radial interna (mm)</b>	0,27±0,24	0,36±0,09	0,19
<b>Longitud epífisis radial externa (mm)</b>	1,66±0,67	1,54±0,32	0,57
<b>Longitud epífisis radial interna (mm)</b>	0,96±0,44	0,94±0,28	0,87
<b>Anchura metafisis radial (mm)</b>	2,02±0,44	1,73±0,34	0,7
<b>anchura fisis proximal (mm)</b>	2,04±0,33	1,84±0,23	0,09
<b>anchura fisis distal (mm)</b>	2,12±0,34	1,99±0,36	0,3
<b>Anchura epífisis media (mm)</b>	2,09±0,23	2,01±0,23	0,4
<b>Ángulo metafisario (grados)</b>	19,48±20,47	17,70±5,67	0,76
<b>Ángulo diáfisis/epífisis (grados)</b>	10,60±3,83	11,81±3,04	0,38
<b>Arco radial máximo (grados)</b>	220,12±56,98	223,20±29,52	0,86
<b>Inclinación radial (grados)</b>	19,69±5,60	21,27±3,16	0,38
<b>Inclinación volar (grados)</b>	15,81±14,01	23,14±4,82	0,87

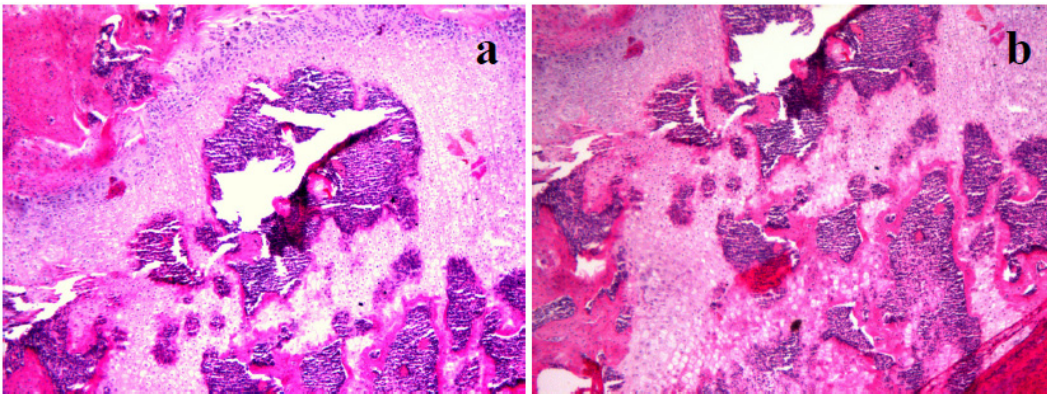
Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$ .

#### 5.4.2.2 Estudio histológico

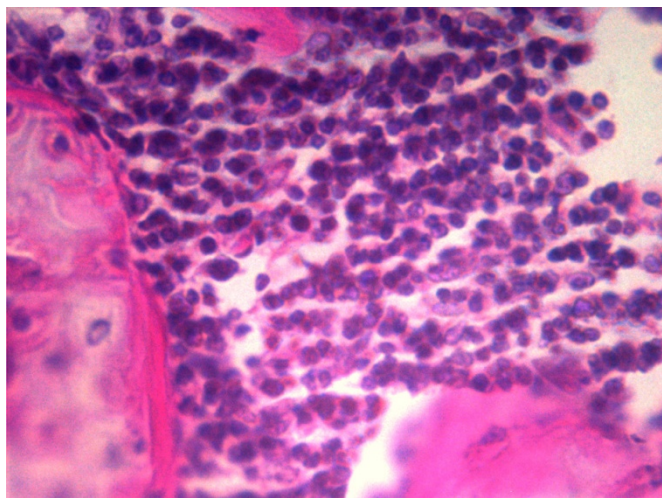
En la mayoría de los casos se ha observado fracaso del trasplante. En algunos casos se ha observado placa de crecimiento completa. En uno de estos casos, en el que se ha observado placa de crecimiento completa, ésta pierde la arquitectura normal (Fig. 5.22a), se observa pérdida de tejido hematopoyético en médula ósea, siendo sustituida por tejido adiposo. Se pierden trabéculas epifisarias y metafisarias. En otros casos se observa amplias áreas acelulares en la placa de crecimiento, ausencia de células en la zona germinativa, ausencia del hueso supra-placa, y ausencia de osteoblastos en las trabéculas metafisarias (Fig. 5.22b). En un caso de este grupo se ha observado la placa hipertrófica, por aumento del número de células hipertróficas, infiltrada toda ella por células mononucleadas, de hábito linfocitario, que rompen la arquitectura de la placa (Fig. 5.23 a y b; Fig. 5.24).



**Figura 5.22** (Fresco 12 semanas) a) Placa de crecimiento trasplantada con pérdida de la arquitectura normal (H-E 4x). b) Placa de crecimiento pérdida de la arquitectura de la zona germinativa y proliferativa (H-E 10x).



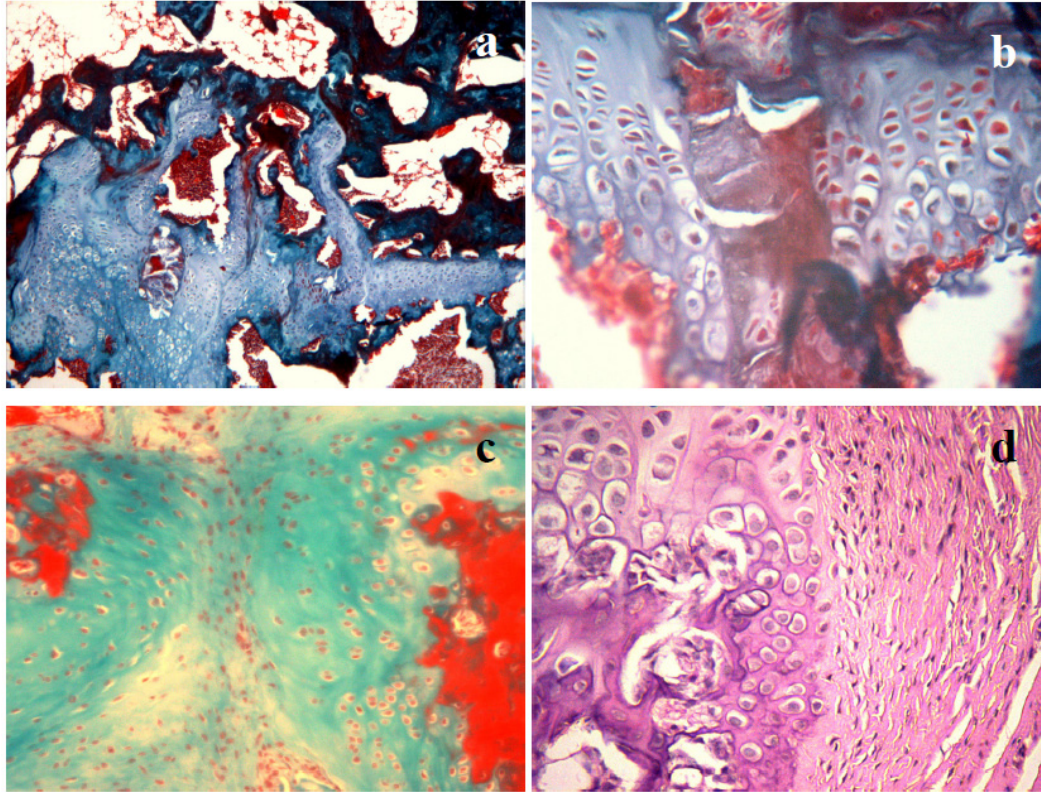
**Figura 5.23** (Fresco 12 semanas) a) Placa de crecimiento hipertrófica con infiltración linfocitaria (H-E 4x). b) Placa de crecimiento con necrosis e infiltración linfocitaria (H-E 10x).



**Figura 5.24** (Fresco 12 semanas) Infiltrado linfocitario en placa de crecimiento (H-E 40x).



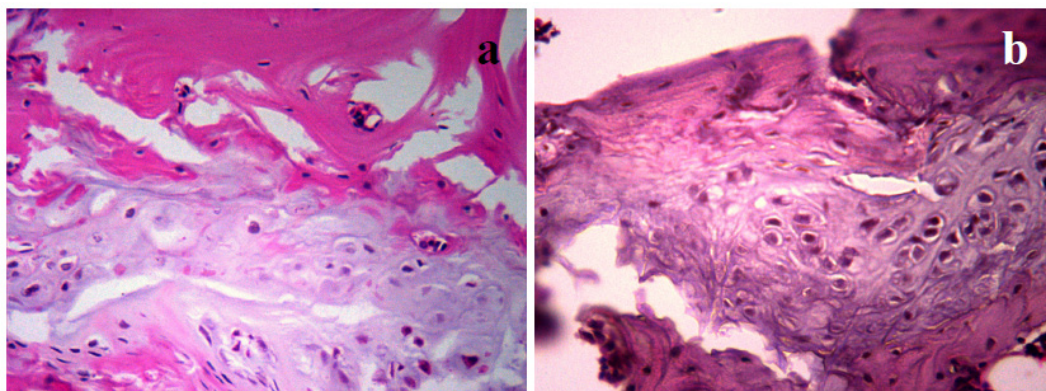
En el resto de los casos se han observado: estructura irregular de la placa (Fig. 5.25a), necrosis parcial de la placa (Fig. 5.25b), puentes de tejido fibroso (Fig. 5.25c). Fibrosis del anillo pericondral (Fig. 5.25d).



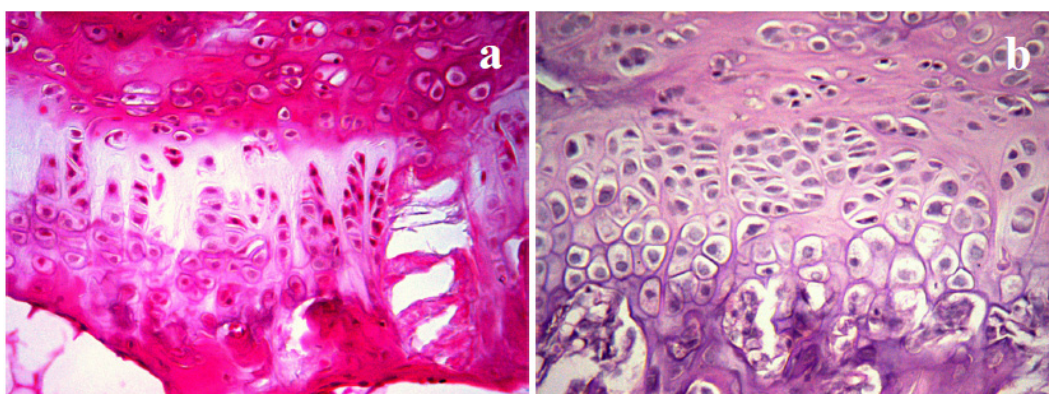
**Figura 5.25** (Fresco 12 semanas) a) Estructura irregular de la placa trasplantada (H-E 4x). b) Necrosis parcial de la placa de crecimiento (Tricrómico de Masson 20x). c) Puentes de tejido fibroso en la placa de crecimiento (Tricrómico de Masson 20x). d) Fibrosis del anillo pericondral (H-E 20x).

### Hueso supra-placa

En los casos de necrosis completa de la placa no se observa hueso supra-placa, o bien aparece un tejido amorfo entre la placa y los restos de hueso supra-placa (Fig. 5.26a, Fig. 5.26b). En uno de los casos en el que se ha observado necrosis de placa, se aprecia una imagen “en sueltas de globos” de células de hábito condral en la región que corresponde al hueso supra-placa (Fig. 5.27 a y b).

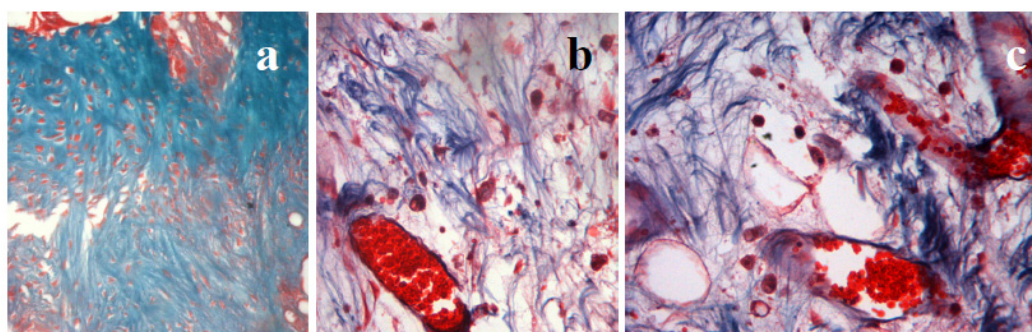


**Figura 5.26** (Fresco 12 semanas) a) Ausencia de hueso supra-placa en casos de necrosis de la placa (H-E 20x). b) Necrosis parcial de la placa de crecimiento (H-E 20x).



**Figura 5.27** (Fresco 12 semanas) a y b) Imágenes de condrocitos en “suelta de globos” en la región del hueso supra-placa a) Se acompaña de necrosis y áreas acelulares en la placa de crecimiento H-E 4x. b) Se observan agrupaciones de condrocitos de la placa de crecimiento H-E 20x.

Médula ósea: En algunos casos se ha observado, junto a la ausencia de tejido hematopoyético, la presencia de un tejido fibroso próximo a la placa (Fig. 5.28a). En zonas de la diáfisis se aprecia un tejido de reticular (Fig. 5.28 b y c).



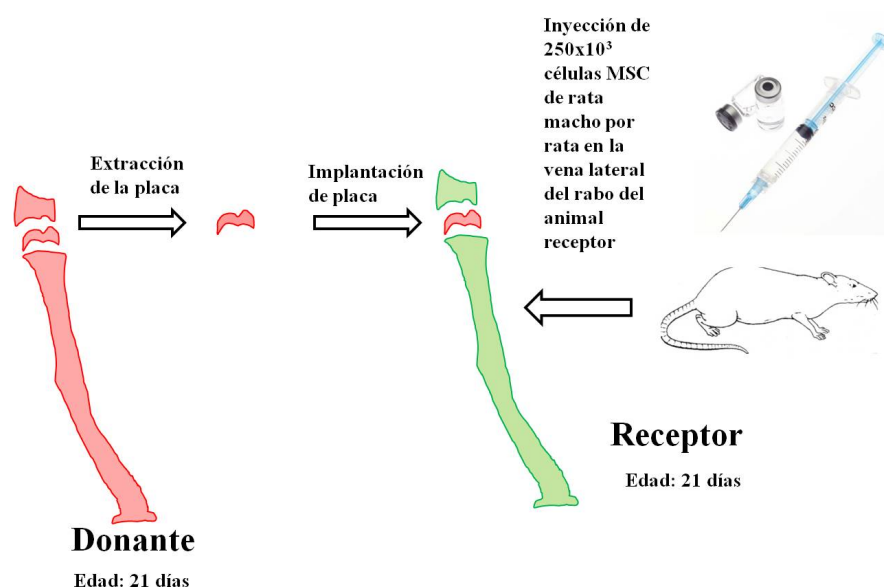
**Figura 5.28** (Fresco 12 semanas) a) Médula ósea de la extremidad trasplantada (Tricrómico de Masson 10x). b) Tejido fibroso próximo a la placa de crecimiento con necrosis (Tricrómico de Masson 20x). c) Fibrosis medular, tejido conectivo de colágeno (Tricrómico de Masson 20x).



### 5.4.2.3 Resumen del grupo trasplante en fresco de 12 semanas de evolución

En este grupo se observan alteraciones macroscópicas y radiológicas en comparación con el grupo control. En todos los casos se ha observado fracaso del trasplante y ausencia de hueso supra-placa.

### 5.4.3 Trasplante en fresco con administración de células (MSC) de 6 semanas de evolución (esquema 3)



**Esquema 3.** Esquema de la intervención trasplante en fresco ortotópico avascular de placa de crecimiento de radio distal con aporte de células MSC.

#### 5.4.3.1 Estudio clínico y radiológico

En el examen macroscópico de las extremidades intervenidas se aprecia una desviación radial del carpo en la mayoría de los animales (Fig 5.29 a).

El examen clínico de las extremidades intervenidas revela una disminución significativa de la flexoextensión de la muñeca y de la pronosupinación (Tabla V).

El examen radiológico muestra una disminución significativa de la longitud del cúbito y del radio, un aumento de la anchura metafisaria y un aumento de la anchura de la fisis proximal (Fig 5.29 b y tabla VI).

En el resto de parámetros medidos no presentan alteraciones significativas.



**Figura 5.29** a) Extremidad anterior perteneciente al grupo trasplante de placa de crecimiento en fresco + células 6 semanas de evolución. b) Imagen radiológica, proyección anteroposterior del antebrazo, perteneciente al grupo trasplante en fresco + células 6 semanas de evolución.

**Tabla V.** Comparación de los parámetros clínicos entre la extremidad trasplantada y la extremidad control en el grupo de trasplante en fresco con administración de células de 6 semanas de evolución.

<b>Trasplante fresco + células 6 semanas (n=12)</b>	<b>Articulación trasplantada (media ± DE)</b>	<b>Articulación control (media ± DE)</b>	<b>p</b>
<b>Extensión Carpo (grados)</b>	90 ± 7,07	97,5 ± 4,52	<b>0,05*</b>
<b>Flexión Carpo (grados)</b>	76.66 ± 21,88	106,25 ± 7,11	<b>0,01*</b>
<b>Supinación (grados)</b>	8,91 ± 5.6	17,5 ± 2,61	<b>0,01*</b>
<b>Pronación (grados)</b>	8,5 ± 5,29	19,16 ± 7,01	<b>0,00*</b>
<b>Extensión Codo (grados)</b>	-5 ± 0	-5± 0	<b>**</b>
<b>Flexión Codo (grados)</b>	120 ± 0	120 ± 0	<b>**</b>
<b>Diámetro antebrazo (mm)</b>	2,15 ± 0,73	1.97 ± 0,28	<b>0,42</b>
<b>Diámetro brazo (mm)</b>	3,83 ± 0,35	3,92 ± 0,74	<b>0,63</b>

Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$ . \*\*No puede calcularse T porque las desviaciones típicas de ambos grupos son 0.

**Tabla VI.** Comparación de los parámetros radiológicos entre la extremidad trasplantada y la extremidad control en el grupo de trasplante en fresco con administración de células de 6 semanas de evolución.

<b>Trasplante fresco + células 6 semanas (n=12)</b>	<b>Articulación trasplantada (media ± DE)</b>	<b>Articulación control (media ± DE)</b>	<b>p</b>
<b>longitud cúbito (mm)</b>	24,19 ± 0,63	27,02 ± 0,53	<b>0,6</b>
<b>Longitud radio (mm)</b>	16,85 ± 1,03	20,75 ± 0,44	<b>0,00*</b>
<b>Longitud eje proximal radio (mm)</b>	7,65 ± 0,64	8,94 ± 0,56	<b>0,00*</b>
<b>Longitud eje distal radio (mm)</b>	9,15 ± 1	11,96 ± 0,76	<b>0,00*</b>
<b>Longitud fisis radial externa (mm)</b>	0,48 ± 0,27	0,62 ± 0,12	<b>0,18</b>
<b>Longitud fisis radial media (mm)</b>	0,46 ± 0,15	0,38 ± 0,12	<b>0,15</b>
<b>Longitud fisis radial interna (mm)</b>	0,53 ± 0,3	0,56 ± 0,17	<b>0,69</b>
<b>Longitud epífisis radial externa (mm)</b>	1,43 ± 0,16	1,48 ± 0,13	<b>0,45</b>
<b>Longitud epífisis radial interna (mm)</b>	1,06 ± 0,18	0,96 ± 0,08	<b>0,12</b>
<b>Anchura metáfisis radial (mm)</b>	2,11 ± 0,23	1,82 ± 0,18	<b>0,02*</b>
<b>anchura fisis proximal (mm)</b>	2,13 ± 0,28	1,79 ± 0,13	<b>0,02*</b>
<b>anchura fisis distal (mm)</b>	2,06 ± 0,26	1,93 ± 0,14	<b>0,14</b>
<b>Anchura epífisis media (mm)</b>	2,1 ± 0,19	1,94 ± 0,13	<b>0,02*</b>
<b>Ángulo metafisario (grados)</b>	166,3 ± 11,67	160,27 ± 3,86	<b>0,11</b>
<b>Ángulo diáfisis/epífisis (grados)</b>	86,78 ± 4,12	90,25 ± 5,99	<b>0,11</b>
<b>Arco radial máximo (grados)</b>	75,76 ± 27,65	64,8 ± 8,16	<b>0,2</b>
<b>Inclinación radial (grados)</b>	18,54 ± 3,39	21,92 ± 1,53	<b>0,05*</b>
<b>Inclinación volar (grados)</b>	3,2 ± 15,51	18,55 ± 4,76	<b>0,006*</b>

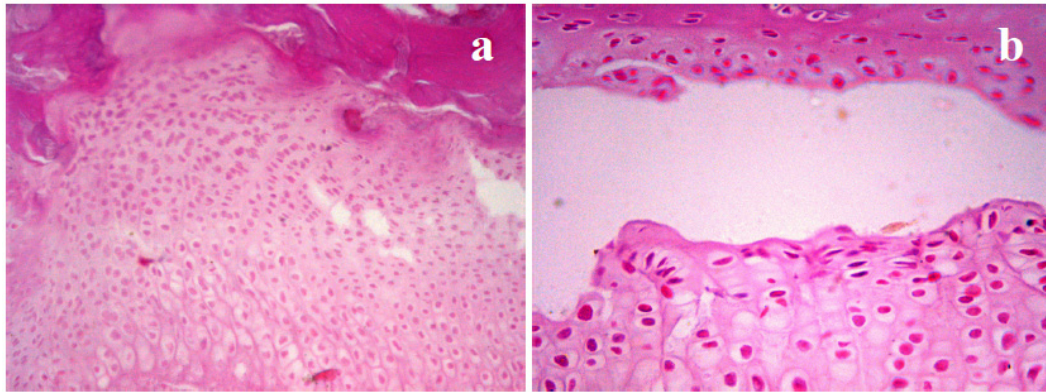
Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$ .

#### 5.4.3.2 Estudio histológico

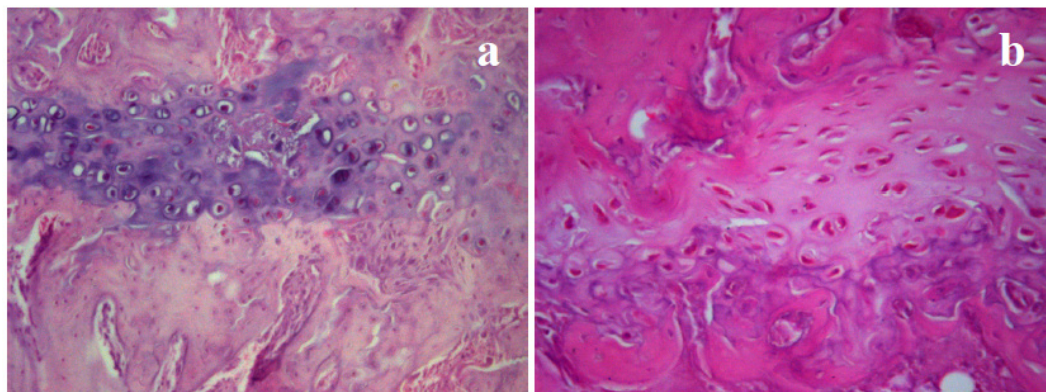
En todos los casos de este grupo se ha observado fracaso del trasplante de la placa de crecimiento.

En un caso, en un sector de la placa se ha observado un aumento del número de células de la zona del proliferativo (Fig. 5.30a). En otro caso, además de la necrosis celular de la placa, se ha observado una discontinuidad entre la zona germinativa y la zona proliferativa (Fig. 5.30b). En los demás casos se han observado restos necrosados de placas de crecimiento rodeado completamente por hueso compacto (Fig. 5.31 a y b).

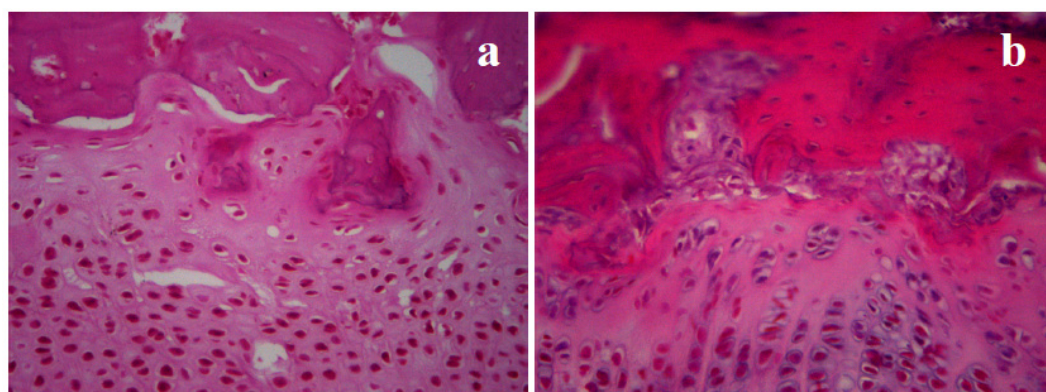
Hueso supra-placa: Se observa pérdida de su arquitectura. Predomina el componente de hueso lamelar, que además presenta un grosor mayor de lo habitual. Se observa ausencia de hueso inmaduro en las zonas en las que no se observan células en la zona germinativa de la placa de crecimiento (Fig. 5.32 a y b).



**Figura 5.30** (Fresco + células 6 semanas) a) Placa de crecimiento con hipertrofia del proliferativo F-253--10 144 (H-E 20x). b) Caso con necrosis de la placa F-252--10 144. (H-E20x) placa. Fractura placa y necrosis (H-E 20x).



**Figura 5.31** (Fresco + células 6 semanas) a) Hueso compacto rodeando a la placa de crecimiento (H-E 20x). b) Hueso compacto rodeando a la placa de crecimiento, se observa la disminución de la basofilia de los núcleos (H-E 20x).



**Figura 5.32** (Fresco + células 6 semanas) a y b) Placa de crecimiento con disminución de hueso inmaduro en el hueso supra-placa (H-E 20x).

### 5.4.3.3 Resumen del grupo trasplante en fresco con administración de células (MSC) de 6 semanas de evolución

En este grupo se observan alteraciones macroscópicas y radiológicas en comparación con el grupo control. En todos los casos de este grupo se ha observado fracaso del trasplante de la placa de crecimiento. La zona de la placa de crecimiento se encuentra rodeada completamente por hueso compacto. El hueso supra-placa pierde su arquitectura normal.

### 5.4.4 Trasplante en fresco con administración de células (MSC) de 12 semanas de evolución

#### 5.4.4.1 Estudio clínico y radiológico

En el examen macroscópico de las extremidades se aprecia una leve desviación radial de la muñeca únicamente en algunos casos (Fig 5.33 a).

El examen clínico de las extremidades intervenidas revela una disminución significativa de la flexoextensión de la muñeca, de la pronosupinación y del diámetro del brazo (Tabla VII).

El examen radiológico muestra una disminución significativa de la longitud del cúbito y del radio, disminución de la longitud de la fisis y epífisis externas. También se observa un aumento de la anchura de la metáfisis, fisis y epífisis radial (Fig 5.33 b y Tabla VII).



**Figura 5.33** a) Extremidad anterior perteneciente al grupo trasplante de placa de crecimiento en 12 semanas de evolución con células. b) Imagen radiológica, proyección anteroposterior del antebrazo, perteneciente al grupo trasplante con células de 12 semanas de evolución.

**Tabla VII.** Comparación de los parámetros clínicos entre la extremidad trasplantada y la extremidad control en el grupo de trasplante en fresco con administración de células de 12 semanas de evolución.

<b>Trasplante + células 12 semanas (n=10)</b>	<b>Articulación trasplantada (media ± DE)</b>	<b>Articulación control (media ± DE)</b>	<b>p</b>
<b>Extensión Carpo (grados)</b>	95,5 ± 10,12	106 ± 5,16	<b>0,01*</b>
<b>Flexión Carpo (grados)</b>	80 ± 30,91	120 ±	<b>0,03*</b>
<b>Supinación (grados)</b>	4,8 ± 3,39	13 ± 2,58	<b>0,00*</b>
<b>Pronación (grados)</b>	4,8 ± 3,39	13 ± 2,58	<b>0,00*</b>
<b>Extensión Codo (grados)</b>	-3 ± 2,58	-3 ± 2,58	<b>1</b>
<b>Flexión Codo (grados)</b>	120	120	<b>**</b>
<b>Diámetro antebrazo (mm)</b>	2,22 ± 0,32	2,33 ± 0,4	<b>0,5</b>
<b>Diámetro brazo (mm)</b>	4,23 ± 0,28	4,52 ± 0,27	<b>0,03*</b>

Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$ . \*\*No puede calcularse T porque las desviaciones típicas de ambos grupos son 0.

**Tabla VIII.** Comparación de los parámetros radiológicos entre la extremidad trasplantada y la extremidad control en el grupo de trasplante en fresco con administración de células de 12 semanas de evolución.

<b>Trasplante + células 12 semanas (n=10)</b>	<b>Articulación trasplantada (media ± DE)</b>	<b>Articulación control (media ± DE)</b>	<b>p</b>
<b>longitud cúbito (mm)</b>	24,84 ± 2,09	29,64 ± 2,09	<b>0,00*</b>
<b>Longitud radio (mm)</b>	17,48 ± 1,65	23,23 ± 0,51	<b>0,00*</b>
<b>Longitud eje proximal radio (mm)</b>	7,34 ± 0,82	17,48 ± 1,66	<b>0,00*</b>
<b>Longitud eje distal radio (mm)</b>	9,79 ± 1,37	13,95 ± 0,6	<b>0,00*</b>
<b>Longitud fisis radial externa (mm)</b>	0,26 ± 0,13	0,46 ± 0,04	<b>0,01*</b>
<b>Longitud fisis radial media (mm)</b>	0,31 ± 0,06	0,26 ± 0,18	<b>0,45</b>
<b>Longitud fisis radial interna (mm)</b>	0,29 ± 0,19	0,36 ± 0,08	<b>0,32</b>
<b>Longitud epífisis radial externa (mm)</b>	1,38 ± 0,18	1,63 ± 0,3	<b>0,04*</b>
<b>Longitud epífisis radial interna (mm)</b>	0,96 ± 0,18	0,99 ± 0,26	<b>0,73</b>
<b>Anchura metáfisis radial (mm)</b>	2,08 ± 0,22	1,77 ± 0,32	<b>0,02*</b>
<b>anchura fisis proximal (mm)</b>	2,12 ± 0,26	1,84 ± 0,15	<b>0,00*</b>
<b>anchura fisis distal (mm)</b>	2,07 ± 0,29	2,03 ± 0,19	<b>0,76</b>
<b>Anchura epífisis media (mm)</b>	2,21 ± 0,31	1,95 ± 0,14	<b>0,02*</b>
<b>Ángulo metafisario (grados)</b>	94,5 ± 6,02	93,73 ± 4,21	<b>0,74</b>
<b>Ángulo diáfisis/epífisis (grados)</b>	167,42 ± 9,43	163,58 ± 2,62	<b>0,23</b>
<b>Arco radial máximo (grados)</b>	55,37 ± 5,91	51,6 ± 2,43	<b>0,08</b>
<b>Inclinación radial (grados)</b>	24,84 ± 9,58	22,54 ± 3,15	<b>0,48</b>
<b>Inclinación volar (grados)</b>	15,06 ± 5,64	14,55 ± 1,85	<b>0,79</b>

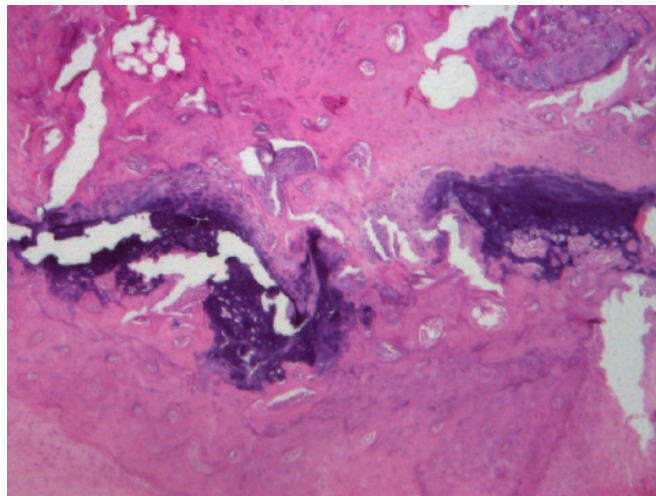
Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$ .



#### 5.4.4.2 Estudio histológico

En todos los casos de este grupo se ha observado fracaso del trasplante de la placa de crecimiento.

El hallazgo más frecuente es la presencia de abundante hueso compacto alrededor de los restos de placa de crecimiento (Fig.5.34).



**Figura 5.34** Hueso compacto alrededor de los restos de la placa de crecimiento trasplantada (H-E 4x).

#### 5.4.4.3 Resumen del grupo trasplante en fresco con administración de células (MSC) de 12 semanas de evolución

En este grupo se observan alteraciones macroscópicas y radiológicas en comparación con el grupo control. En todos los casos de este grupo se ha observado fracaso del trasplante de la placa de crecimiento. El hallazgo más frecuente es la presencia de abundante hueso compacto alrededor de los restos de placa de crecimiento.

#### 5.4.5 Estudio comparativo entre los grupos de trasplante en fresco de 6 y 12 semanas con los grupos de trasplante en fresco con aporte de células de 6 y 12 semanas

##### 5.4.5.1 Estudio comparativo, con y sin células, del trasplante en fresco de 6 semanas de evolución.

El examen clínico de las extremidades intervenidas revela un aumento de la extensión de la muñeca en el grupo y mayores grados de supinación en el grupo con aporte de células. El resto de los parámetros no presentan diferencias significativas (Tabla IX).

El examen radiológico muestra diferencias en las longitudes radiales proximal y distal pero no se observan diferencias en las longitudes del cúbito o del radio. En el resto de parámetros medidos no se observan diferencias significativas (Fig 5.35 y Tabla X).

**Tabla IX.** Comparación de los parámetros clínicos entre el trasplante en fresco de 6 semanas de evolución y el trasplante en fresco con aporte de células de 6 semanas de evolución.

<b>Trasplante 6 semanas</b>	<b>Trasplante en fresco + células (n=12)</b> (media ± DE)	<b>Trasplante en fresco (n=8)</b> (media ± DE)	<b>p</b>
<b>Extensión Carpo</b> (grados)	90 ± 7,07	71,87 ± 25,63	<b>0,03*</b>
<b>Flexión Carpo</b> (grados)	76.66 ± 21,88	49,37 ± 42,63	<b>0,1</b>
<b>Supinación</b> (grados)	8,91 ± 5.6	-4,38 ± 9,43	<b>0,05*</b>
<b>Pronación</b> (grados)	8,5 ± 5,29	13,75 ± 11,88	<b>0,21</b>
<b>Extensión Codo</b> (grados)	-5 ± 0	-9,38 ± 1,77	<b>0,1</b>
<b>Flexión Codo</b> (grados)	120 ± 0	116,25 ± 6,94	<b>0,07</b>
<b>Diámetro antebrazo</b> (mm)	2,15 ± 0,73	2,03 ± 0,26	<b>0,62</b>
<b>Diámetro brazo</b> (mm)	3,83 ± 0,35	4,14 ± 0,45	<b>0,08</b>

Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$





**Figura 5.35** Imagen radiológica, proyección anteroposterior del antebrazo, perteneciente al grupo trasplante con y sin células.

**Tabla X.** Comparación de los parámetros radiológicos entre el trasplante en fresco de 6 semanas de evolución y el trasplante en fresco con aporte de células de 6 semanas de evolución.

Trasplante 6 semanas	Trasplante en fresco + células (n=12) (media ± DE)	Trasplante en fresco (n=8) (media ± DE)	p
longitud cúbito (mm)	24,19 ± 0,63	23,40±1,44	<b>0,17</b>
Longitud radio (mm)	16,85± 1,03	16,92±2,14	<b>0,93</b>
Longitud eje proximal radio (mm)	7,65 ± 0,64	6,58±0,84	<b>0,004*</b>
Longitud eje distal radio (mm)	9,15 ± 1	13,75 ±1,58	<b>0,04*</b>
Longitud fisis radial externa (mm)	0,48 ± 0,27	0,50±0,27	<b>0,89</b>
Longitud fisis radial media (mm)	0,46 ± 0,15	0,31±0,17	<b>0,04*</b>
Longitud fisis radial interna (mm)	0,53 ± 0,3	0,39±0,27	<b>0,26</b>
Longitud epífisis radial externa (mm)	1,43 ± 0,16	1,86± 0,89	<b>0,22</b>
Longitud epífisis radial interna (mm)	1,06 ± 0,18	1,31±1,02	<b>0,5</b>
Anchura metáfisis radial (mm)	2,11 ± 0,23	1,97±0,54	<b>0,47</b>
anchura fisis proximal (mm)	2,13 ± 0,28	2,03±0,53	<b>0,57</b>
anchura fisis distal (mm)	2,06 ± 0,26	2,09±0,60	<b>0,88</b>
Anchura epífisis media (mm)	2,1 ± 0,19	1,99±0,42	<b>0,5</b>
Ángulo metafisario(grados)	23,8 ± 11,67	24,03±15,22	<b>0,5</b>
Ángulo diáfisis/epífisis (grados)	18,25 ± 4, 12	17,80±10,46	<b>0,78</b>
Arco radial máximo (grados)	216,27 ± 27,65	215,61±46,28	<b>0,34</b>
Inclinación radial (grados)	18,54 ± 3,39	19,36±8,88	<b>0,89</b>
Inclinación volar (grados)	3,2 ± 15,51	10,91±14,07	<b>0,27</b>

Test de la t de student. \* Significación estadística para p<0,05

#### 5.4.5.2 Estudio comparativo, con y sin células, del trasplante en fresco de 12 semanas de evolución.

El examen clínico de las extremidades intervenidas revela un aumento de la extensión de la muñeca en el grupo con aporte de células. El resto de los parámetros no presentan diferencias significativas (Tabla XI).

El examen radiológico muestra diferencias únicamente en la longitud radial distal. En el resto de parámetros medidos no se observan diferencias significativas (Fig 5.36 y Tabla XII).

**Tabla XI.** Comparación de los parámetros clínicos entre el trasplante en fresco de 12 semanas de evolución y el trasplante en fresco con aporte de células de 12 semanas de evolución.

Trasplante 12 semanas	Trasplante en fresco + células (n=9) (media $\pm$ DE)	Trasplante en fresco (n=14) (media $\pm$ DE)	p
<b>Extensión Carpo</b> (grados)	95,5 $\pm$ 10,12	85,38 $\pm$ 10,50	<b>0,02*</b>
<b>Flexión Carpo</b> (grados)	80 $\pm$ 30,91	86,15 $\pm$ 30,76	<b>0,17</b>
<b>Supinación</b> (grados)	4,8 $\pm$ 3,39	3,69 $\pm$ 2,98	<b>0,9</b>
<b>Pronación</b> (grados)	4,8 $\pm$ 3,39	6,38 $\pm$ 5,24	<b>0,67</b>
<b>Extensión Codo</b> (grados)	-3 $\pm$ 2,58	-5,00 $\pm$ 0,00	<b>0,11</b>
<b>Flexión Codo</b> (grados)	120	120,00 $\pm$ 0,00	<b>**</b>
<b>Diámetro antebrazo</b> (mm)	2,22 $\pm$ 0,32	2,16 $\pm$ 0,25	<b>0,008*</b>
<b>Diámetro brazo</b> (mm)	4,23 $\pm$ 0,28	4,40 $\pm$ 0,27	<b>0,49</b>

Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$ . \*\*No puede calcularse T porque las desviaciones típicas de ambos grupos son 0.



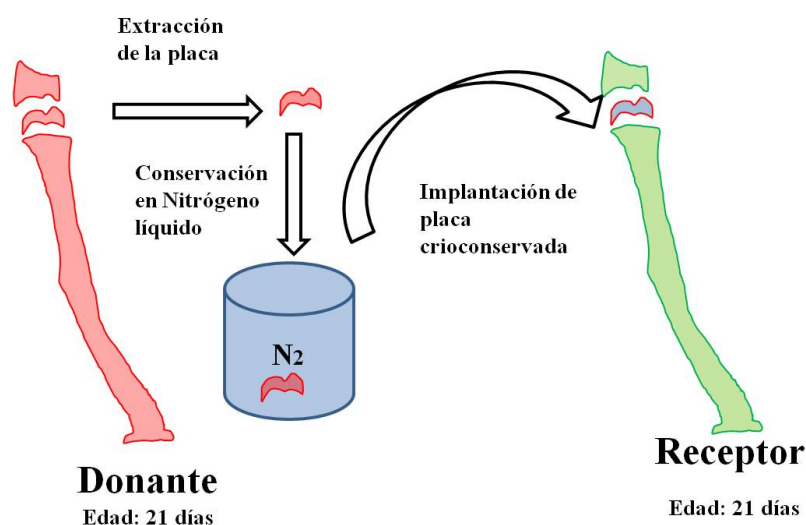
**Figura 5.36** Imágenes radiológicas, proyección anteroposterior del antebrazo, perteneciente a los grupos de trasplante con y sin células de 12 semanas de evolución.

**Tabla XII.** Comparación de los parámetros radiológicos entre el trasplante en fresco de 12 semanas de evolución y el trasplante en fresco con aporte de células de 12 semanas de evolución.

Trasplante 12 semanas	Trasplante en fresco + células (n=9) (media ± DE)	Trasplante en fresco (n=14) (media ± DE)	p
longitud cúbito (mm)	24,84±2,09	26,16±2,20	<b>0,16</b>
Longitud radio (mm)	17,48 ± 1,65	19,62±2,94	<b>0,05</b>
Longitud eje proximal radio (mm)	7,34 ± 0,82	7,87±1,54	<b>0,33</b>
Longitud eje distal radio (mm)	9,79 ± 1,37	11,91±2,74	<b>0,03*</b>
Longitud fisis radial externa (mm)	0,26 ± 0,13	0,26±0,13	<b>0,92</b>
Longitud fisis radial media (mm)	0,31 ± 0,06	0,30±0,20	<b>0,7</b>
Longitud fisis radial interna (mm)	0,29 ± 0,19	0,27±0,24	<b>0,69</b>
Longitud epífisis radial externa (mm)	1,38 ± 0,18	1,66±0,67	<b>0,9</b>
Longitud epífisis radial interna (mm)	0,96 ± 0,18	0,96±0,44	<b>0,99</b>
Anchura metáfisis radial (mm)	2,08 ± 0,22	2,02±0,44	<b>0,77</b>
anchura fisis proximal (mm)	2,12 ± 0,26	2,04±0,33	<b>0,5</b>
anchura fisis distal (mm)	2,07 ± 0,29	2,12±0,34	<b>0,71</b>
Anchura epífisis media (mm)	2,21 ± 0,31	2,09±0,23	<b>0,71</b>
Ángulo metafisario(grados)	18,72 ± 6,02	19,48±20,47	<b>0,77</b>
Ángulo diáfisis/epífisis (grados)	167,42 ± 9,43	160,60±3,83	<b>0,52</b>
Arco radial máximo (grados)	225,37 ± 5,91	220,12±56,98	<b>0,37</b>
Inclinación radial (grados)	24,84 ± 9,58	19,69±5,60	<b>0,1</b>
Inclinación volar (grados)	15,06 ± 5,64	15,81±14,01	<b>0,87</b>

Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$

#### 5.4.6 Trasplante de placa crioconservada de 6 semanas de evolución (esquema 2)



**Esquema 2.** Esquema de la intervención trasplante en criopreservado ortotópico avascular de placa de crecimiento de radio distal.

#### 5.4.6.1 Estudio clínico y radiológico

En el examen macroscópico de las extremidades intervenidas se observa la presencia de manos zambas y un acortamiento algo mayor que en los grupos de trasplante en fresco de la longitud del antebrazo (Fig 37 a).

En el examen clínico de las extremidades intervenidas se observa una disminución significativa de la extensión, la flexión volar, la pronosupinación y el diámetro del brazo respecto a las extremidades contralaterales (Tabla XIII).

El examen radiológico muestra una disminución significativa de la longitud del cúbito y del radio, de la longitud del eje proximal del radio, así como de la longitud de la fisis radial externa (Fig 37 b y Tabla XIV).



**Figura 5.37** a) Extremidad anterior perteneciente al grupo trasplante grupo trasplante en criopreservado de 6 semanas de evolución. b) Imagen radiológica, proyección anteroposterior del antebrazo, perteneciente al grupo trasplante criopreservado de 6 semanas de evolución.

**Tabla XIII.** Comparación de los parámetros clínicos de entre la extremidad trasplantada y la extremidad control en el grupo de trasplante criopreservado de 6 semanas de evolución.

<b>Trasplante criopreservado 6 semanas (n=7)</b>	<b>Articulación trasplantada (media ± DE)</b>	<b>Articulación control (media ± DE)</b>	<b>p</b>
<b>Extensión Carpo</b> (grados)	58,57±33,38	92,14±10,13	0,04*
<b>Flexión Carpo</b> (grados)	70,00±32,15	121,43±7,68	0,05*
<b>Supinación</b> (grados)	0,00±7,64	16,43±6,50	0,00*
<b>Pronación</b> (grados)	6,43 ±4,76	12,86±6,60	0,01*
<b>Extensión Codo</b> (grados)	-13,57±4,76	-10,71±0,00	0,17
<b>Flexión Codo</b> (grados)	123,57±13,14	130,00±0,00	0,24
<b>Diámetro antebrazo</b> (mm)	1,84±0,21	1,87±0,30	0,29
<b>Diámetro brazo</b> (mm)	4,04±0,24	4,41±0,13	0,02*

Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$ .

**Tabla XIV.** Comparación de los parámetros radiológicos entre la extremidad trasplantada y la extremidad control en el grupo de trasplante crioconservado de 6 semanas de evolución.

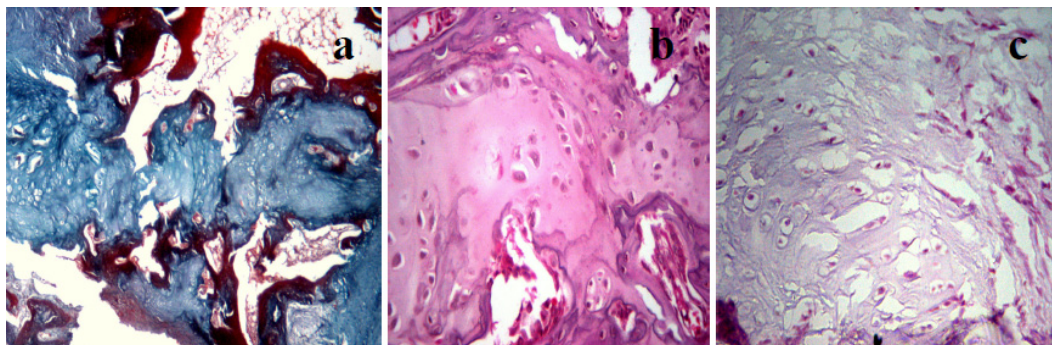
<b>Trasplante criopreservado 6 semanas (n=7)</b>	<b>Articulación trasplantada (media ± DE)</b>	<b>Articulación control (media ± DE)</b>	<b>p</b>
<b>longitud cúbito (mm)</b>	23,57±1,27	27,55±0,58	0,00*
<b>Longitud radio (mm)</b>	14,73±1,26	20,68±0,42	0,00*
<b>Longitud eje proximal radio (mm)</b>	6,00±0,65	8,85±0,63	0,00*
<b>Longitud eje distal radio (mm)</b>	8,89±1,07	10,13±3,95	0,44*
<b>Longitud fisis radial externa (mm)</b>	1,42±1,03	0,48±0,12	0,05*
<b>Longitud fisis radial media (mm)</b>	1,29±0,78	0,33±0,03	0,01*
<b>Longitud fisis radial interna (mm)</b>	1,62±1,38	0,40±0,09	0,06*
<b>Longitud epífisis radial externa (mm)</b>	1,07±0,30	1,52±0,08	0,02*
<b>Longitud epífisis radial interna (mm)</b>	0,67±0,31	0,96±0,10	0,04*
<b>Anchura metafisis radial (mm)</b>	1,89±0,47	1,99±0,12	0,6*
<b>anchura fisis proximal (mm)</b>	1,65±0,46	1,96±0,11	0,11*
<b>anchura fisis distal (mm)</b>	1,53±0,26	2,05±0,11	0,01*
<b>Anchura epífisis media (mm)</b>	1,76±0,28	2,10±0,16	0,01*
<b>Ángulo metafisario (grados)</b>	22,22±12,33	17,55±3,75	0,37*
<b>Ángulo diáfisis/epífisis (grados)</b>	9,84±5,13	10,93±2,32	0,62*
<b>Arco radial máximo (grados)</b>	203,46±49,29	231,90±32,69	0,23*
<b>Inclinación radial (grados)</b>	11,92±13,73	24,49±3,85	0,53*
<b>Inclinación volar (grados)</b>	0,32±14,52	22,40±4,60	0,06*

Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$ .

#### 5.4.6.2 Estudio histológico

En todos los casos de este grupo se ha observado fracaso del trasplante de la placa de crecimiento.

Las placas de crecimiento se observan con grandes irregularidades (Fig. 5.38a), necrosadas (Fig. 5.38 b y c). En algunos casos se observa fibrosis alrededor de la placa de crecimiento. Pérdida de tejido hematopoyético, que es sustituido por adipocitos.



**Figura 5.38** (crioconservado 6 semanas) a) Placa de crecimiento con grandes irregularidades morfológicas (H-E 4x). b) Placa de crecimiento con áreas acelulares (H-E 20x). c) Placa de crecimiento con necrosis celular y dehiscencia de la matriz extracelular (H-E 20x).

#### **5.4.6.3 Resumen del grupo trasplante de placa crioconservada de 6 semanas de evolución**

En este grupo se observan alteraciones macroscópicas y radiológicas en comparación con el grupo control. En todos los casos de este grupo se ha observado fracaso del trasplante de la placa de crecimiento.

#### **5.4.7 Trasplante de placa crioconservada de 12 semanas de evolución**

##### **5.4.7.1 Estudio clínico y radiológico**

La observación macroscópica de las extremidades intervenidas revela un predominio de la desviación radial configurando manos zambas (Fig 39 a).

En el examen clínico se observa una disminución significativa de la flexoextensión de la muñeca así como de la pronosupinación (Tabla XV).



**Figura 5.39** a) Extremidad anterior perteneciente al grupo trasplante grupo trasplante en crioconservado de 12 semanas de evolución. b) Imagen radiológica, proyección anteroposterior del antebrazo, perteneciente al grupo trasplante crioconservado de 12 semanas de evolución.

El examen radiológico muestra una disminución significativa de la longitud del cúbito y del radio, así como una disminución de la anchura de la fisis proximal y una disminución de la inclinación radial (Fig 39 b y Tabla XVI).

**Tabla XV.** Comparación de los parámetros clínicos entre la extremidad trasplantada y la extremidad control en el grupo de trasplante crioconservado de 12 semanas de evolución.

<b>Trasplante criopreservado 12 semanas (n=8)</b>	<b>Articulación trasplantada</b> (media $\pm$ DE)	<b>Articulación control</b> (media $\pm$ DE)	<b>p</b>
<b>Extensión Carpo</b> (grados)	79,38 $\pm$ 12,66	110 $\pm$ 0	0,00*
<b>Flexión Carpo</b> (grados)	76,88 $\pm$ 9,61	118,75 $\pm$ 3.53	0,00*
<b>Supinación</b> (grados)	2,50 $\pm$ 2,67	18,75 $\pm$ 3.53	0,00*
<b>Pronación</b> (grados)	3,13 $\pm$ 3,72	18,75 $\pm$ 3.53	0,00*
<b>Extensión Codo</b> (grados)	-6,25 $\pm$ 2,31	-5 $\pm$ 0	0,17
<b>Flexión Codo</b> (grados)	120,00 $\pm$ 0	120 $\pm$ 0	**
<b>Diámetro antebrazo</b> (mm)	2,00 $\pm$ 0,16	1,95 $\pm$ 0.14	0,51
<b>Diámetro brazo</b> (mm)	4,71 $\pm$ 0,20	4,62 $\pm$ 0.21	0,4

Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$ . \*\*No puede calcularse T porque las desviaciones típicas de ambos grupos son 0.



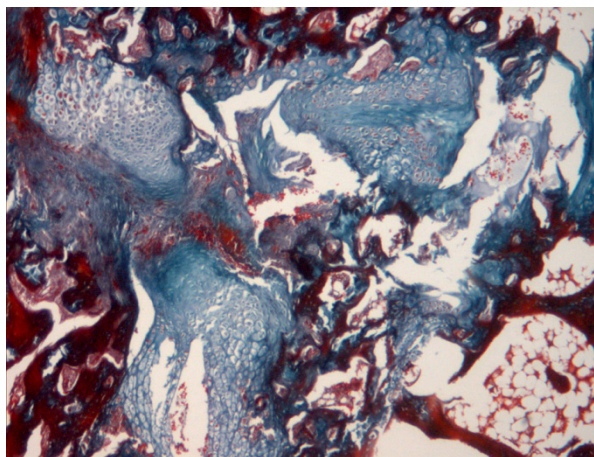
**Tabla XVI.** Comparación de los parámetros radiológicos entre la extremidad trasplantada y la extremidad control en el grupo de trasplante crioconservado de 12 semanas de evolución.

<b>Trasplante criopreservado 12 semanas (n=8)</b>	<b>Articulación trasplantada (media ± DE)</b>	<b>Articulación control (media ± DE)</b>	<b>p</b>
<b>longitud cúbito (mm)</b>	23,75±1,65	30,11±1,00	0,00*
<b>Longitud radio (mm)</b>	14,82±0,73	23,81±0,54	0,00*
<b>Longitud eje proximal radio (mm)</b>	6,09±0,77	9,58±0,40	0,00*
<b>Longitud eje distal radio (mm)</b>	8,86±0,77	13,90±1,94	0,00*
<b>Longitud fisis radial externa (mm)</b>	0,36±0,41	0,42±0,10	0,7
<b>Longitud fisis radial media (mm)</b>	0,24±0,26	0,28±0,05	0,64
<b>Longitud fisis radial interna (mm)</b>	0,31±0,36	0,28±0,14	0,8
<b>Longitud epífisis radial externa (mm)</b>	1,55±0,22	1,63±0,11	0,35
<b>Longitud epífisis radial interna (mm)</b>	1,21±0,23	1,00±0,13	0,04*
<b>Anchura metáfisis radial (mm)</b>	2,15±0,49	1,92±0,19	0,24
<b>anchura fisis proximal (mm)</b>	2,34±0,35	1,96±0,21	0,02*
<b>anchura fisis distal (mm)</b>	2,27±0,32	2,12±0,18	0,26
<b>Anchura epífisis media (mm)</b>	2,16±0,17	2,05±0,07	0,13
<b>Ángulo metafisario (grados)</b>	-7,69±28,23	20,34±5,11	0,02*
<b>Ángulo diáfisis/epífisis (grados)</b>	8,26±4,79	11,68±3,13	0,11
<b>Arco radial máximo (grados)</b>	208,28±68,32	229,55±52,94	0,5
<b>Inclinación radial (grados)</b>	12,94±6,96	23,30±2,57	0,01*
<b>Inclinación volar (grados)</b>	6,59±14,67	17,68±3,13	0,07

Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$ .

#### 5.4.7.2 Estudio histológico

En todos los casos de este grupo se ha observado fracaso del trasplante de la placa de crecimiento. Las placas aparecen fragmentadas (Fig. 40).



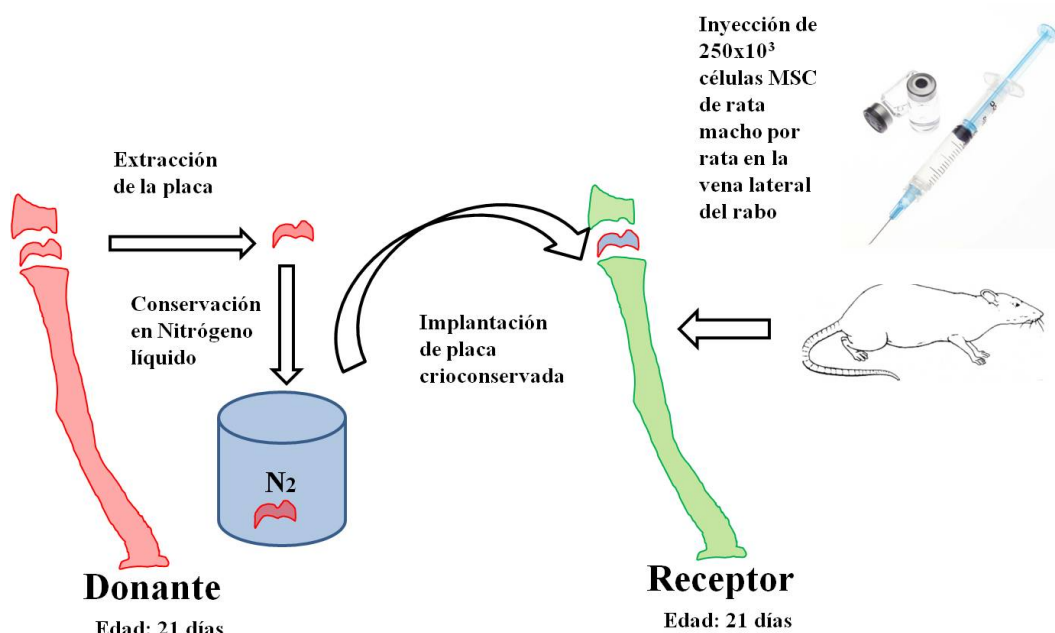
**Figura 5.40** (crioconservado 12 semanas) Placa de crecimiento fragmentada con fibrosis periférica (H-E 4x).



#### 5.4.7.3 Resumen del grupo trasplante de placa crioconservada de 12 semanas de evolución

En este grupo se observan alteraciones macroscópicas y radiológicas en comparación con el grupo control. En todos los casos de este grupo se ha observado fracaso del trasplante de la placa de crecimiento.

#### 5.4.8 Trasplante de placa crioconservada con administración de células (MSC) de 6 semanas de evolución (esquema 4)



Esquema 4. Esquema de la intervención trasplante criopreservado ortotópico avascular de placa de crecimiento de radio distal con aporte de células MSC

##### 5.4.8.1 Estudio clínico y radiológico

En el examen macroscópico de las extremidades se aprecia una desviación radial de todas las extremidades intervenidas así como una disminución de la longitud de éstas (Fig 5.41 a).

El examen clínico de las extremidades intervenidas revela una disminución significativa de la flexoextensión y de la pronosupinación. El resto de los parámetros no presenta diferencias significativas en comparación con la extremidad contralateral (Tabla XVII).

El examen radiológico muestra una disminución significativa de longitud del cúbito y del radio. Una disminución de la longitud de la fisis radial, así como un aumento de la anchura metafisaria y de la epífisis radial externa. El resto de los parámetros no presenta diferencias significativas en comparación con la extremidad contralateral (Fig 5.41 b y tabla XVIII).



**Figura 5.41** a) Extremidad anterior perteneciente al grupo trasplante grupo trasplante criopreservado con aporte de células de 6 semanas de evolución. b) Imagen radiológica proyección anteroposterior del antebrazo, perteneciente al grupo trasplante criopreservado con aporte de células de 6 semanas de evolución.

**Tabla XVII.** Comparación de los parámetros clínicos entre la extremidad trasplantada y la extremidad control en el grupo de trasplante criopreservado con administración de células de 6 semanas de evolución.

<b>Trasplante + células 6 semanas (n=10)</b>	<b>Articulación trasplantada (media ± DE)</b>	<b>Articulación control (media ± DE)</b>	<b>p</b>
<b>Extensión Carpo</b> (grados)	94 ± 6,99	101 ± 7,37	<b>0,04*</b>
<b>Flexión Carpo</b> (grados)	95 ± 17,8	120	<b>0,02*</b>
<b>Supinación</b> (grados)	4,4 ± 3,47	10	<b>0,001*</b>
<b>Pronación</b> (grados)	4,7 ± 3,16	10	<b>0,00*</b>
<b>Extensión Codo</b> (grados)	-5	-5	<b>**</b>
<b>Flexión Codo</b> (grados)	120	120	<b>**</b>
<b>Diámetro antebrazo</b> (mm)	1,85 ± 0,2	1,77 ± 0,08	<b>0,27</b>
<b>Diámetro brazo</b> (mm)	3,68 ± 0,3	4,02 ± 0,49	<b>0,07</b>

Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$ . \*\*No puede calcularse T porque las desviaciones típicas de ambos grupos son 0.

**Tabla XVIII.** Comparación de los parámetros radiológicos entre la extremidad trasplantada y la extremidad control en el grupo de trasplante crioconservado con administración de células de 6 semanas de evolución.

<b>Trasplante + células 6 semanas (n=10)</b>	<b>Articulación trasplantada (media ± DE)</b>	<b>Articulación control (media ± DE)</b>	<b>p</b>
<b>longitud cúbito (mm)</b>	22,98 ± 1,36	27,4 ± 1,17	<b>0,00*</b>
<b>Longitud radio (mm)</b>	15,09 ± 0,69	20,98 ± 0,59	<b>0,00*</b>
<b>Longitud eje proximal radio (mm)</b>	5,52 ± 2,37	8,51 ± 0,4	<b>0,007*</b>
<b>Longitud eje distal radio (mm)</b>	7,64 ± 3,19	12,79 ± 0,43	<b>0,001*</b>
<b>Longitud fisis radial externa (mm)</b>	0,65 ± 0,17	0,53 ± 0,17	<b>0,25</b>
<b>Longitud fisis radial media (mm)</b>	0,74 ± 0,42	0,41 ± 0,04	<b>0,06*</b>
<b>Longitud fisis radial interna (mm)</b>	0,86 ± 0,44	0,52 ± 0,13	<b>0,07*</b>
<b>Longitud epífisis radial externa (mm)</b>	1,52 ± 0,22	1,25 ± 0,19	<b>0,09*</b>
<b>Longitud epífisis radial interna (mm)</b>	1,21 ± 0,54	0,94 ± 0,11	<b>0,21</b>
<b>Anchura metáfisis radial (mm)</b>	2,08 ± 0,19	1,71 ± 0,2	<b>0,004*</b>
<b>anchura fisis proximal (mm)</b>	2,04 ± 0,16	1,81 ± 0,14	<b>0,01*</b>
<b>anchura fisis distal (mm)</b>	2,1 ± 0,2	1,95 ± 0,08	<b>0,1</b>
<b>Anchura epífisis media (mm)</b>	1,98 ± 0,3	1,89 ± 0,2	<b>0,53</b>
<b>Ángulo metafisario (grados)</b>	93,49 ± 4,54	92,55 ± 4,2	<b>0,69</b>
<b>Ángulo diáfisis/epífisis (grados)</b>	161,82 ± 5,13	160,95 ± 9,45	<b>0,83</b>
<b>Arco radial máximo (grados)</b>	66,38 ± 26,68	54,43 ± 2,63	<b>0,26</b>
<b>Inclinación radial (grados)</b>	22,36 ± 6,9	24,52 ± 5	<b>0,51</b>
<b>Inclinación volar (grados)</b>	12,99 ± 0,77	12,55 ± 0,77	<b>0,93</b>

Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$ .

#### 5.4.8.2 Estudio histológico

En todos los casos de este grupo se ha observado fracaso del trasplante de la placa de crecimiento.

#### 5.4.8.3 Resumen del grupo trasplante de placa crioconservada con administración de células (MSC) de 6 semanas de evolución

En este grupo se observan alteraciones macroscópicas y radiológicas en comparación con el grupo control. En todos los casos de este grupo se ha observado fracaso del trasplante de la placa de crecimiento.

#### 5.4.9 Trasplante de placa crioconservada con administración de células (MSC) de 12 semanas de evolución

##### 5.4.9.1 Estudio clínico y radiológico

En el examen macroscópico de las extremidades intervenidas se aprecia un predominio de manos zambas radiales y una disminución leve del tamaño de la extremidad intervenida (Fig 5.42 a).

El examen clínico de las extremidades intervenidas revela una disminución significativa de la flexoextensión y de la pronosupinación. El resto de los parámetros analizados no presentan alteraciones significativas (Tabla XIX).

El examen radiológico muestra una disminución significativa de la longitud de cúbito y radio de la longitud de la fisis radial y aumento de la anchura de la metáfisis radial. En el resto de parámetros medidos no se observan alteraciones significativas (Fig 5.42 b y Tabla XX).



**Figura 5.42** a) Extremidad anterior perteneciente al grupo trasplante grupo trasplante crioconservado con aporte de células de 12 semanas de evolución. b) Imagen radiológica, proyección anteroposterior del antebrazo, perteneciente al grupo trasplante crioconservado con aporte de células de 12 semanas de evolución.

**Tabla XIX.** Comparación de los parámetros clínicos entre la extremidad trasplantada y la extremidad control en el grupo de trasplante crioconservado con administración de células de 12 semanas de evolución.

<b>Trasplante + células 12 semanas (n=8)</b>	<b>Articulación trasplantada (media ± DE)</b>	<b>Articulación control (media ± DE)</b>	<b>p</b>
<b>Extensión Carpo (grados)</b>	85,12 ± 30,82	110	<b>0,056*</b>
<b>Flexión Carpo (grados)</b>	81 ± 23,68	120	<b>0,00*</b>
<b>Supinación (grados)</b>	3,11 ± 3,48	15	<b>0,00*</b>
<b>Pronación (grados)</b>	6,44 ± 5,12	15	<b>0,00*</b>
<b>Extensión Codo (grados)</b>	-5	-5	<b>**</b>
<b>Flexión Codo (grados)</b>	120	120	<b>**</b>
<b>Diámetro antebrazo (mm)</b>	2,3 ± 0,21	2,18 ± 0,29	<b>0,36</b>
<b>Diámetro brazo (mm)</b>	4,33 ± 0,34	4,33 ± 0,32	<b>1</b>

Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$ . \*\*No puede calcularse T porque las desviaciones típicas de ambos grupos son 0.

**Tabla XX.** Comparación de los parámetros radiológicos entre la extremidad trasplantada y la extremidad control en el grupo de trasplante crioconservado con administración de células de 12 semanas de evolución.

<b>Trasplante crioconservado + células 12semanas (n=8)</b>	<b>Articulación trasplantada (media ± DE)</b>	<b>Articulación control (media ± DE)</b>	<b>p</b>
<b>longitud cúbito (mm)</b>	24,38 ± 1,77	30,48 ± 0,5	<b>0,00*</b>
<b>Longitud radio (mm)</b>	15,95 ± 0,79	23,7 ± 0,39	<b>0,00*</b>
<b>Longitud eje proximal radio (mm)</b>	7,02 ± 0,91	9,57 ± 0,43	<b>0,00*</b>
<b>Longitud eje distal radio (mm)</b>	8,72 ± 1,37	15,37 ± 3,34	<b>0,00*</b>
<b>Longitud fisis radial externa (mm)</b>	0,92 ± 0,53	0,35 ± 0,06	<b>0,01*</b>
<b>Longitud fisis radial media (mm)</b>	0,64 ± 0,32	0,28 ± 0,06	<b>0,01*</b>
<b>Longitud fisis radial interna (mm)</b>	0,85 ± 0,51	0,34 ± 0,09	<b>0,01*</b>
<b>Longitud epífisis radial externa (mm)</b>	1,31 ± 0,33	1,36 ± 0,11	<b>0,7</b>
<b>Longitud epífisis radial interna (mm)</b>	0,88 ± 0,58	0,94 ± 0,11	<b>0,8</b>
<b>Anchura metáfisis radial (mm)</b>	2,25 ± 0,23	1,77 ± 0,13	<b>0,00*</b>
<b>anchura fisis proximal (mm)</b>	2,27 ± 0,29	1,88 ± 0,11	<b>0,01*</b>
<b>anchura fisis distal (mm)</b>	2,21 ± 0,4	1,91 ± 0,18	<b>0,07</b>
<b>Anchura epífisis media (mm)</b>	2,02 ± 0,32	1,98 ± 0,15	<b>0,7</b>
<b>Ángulo metafisario(grados)</b>	94,19 ± 4,9	92,4 ± 5,83	<b>0,54</b>
<b>Ángulo diáfisis/epífisis (grados)</b>	159,36 ± 10,7	160,64 ± 2,57	<b>0,74</b>
<b>Arco radial máximo (grados)</b>	64,4 ± 15,01	56,8 ± 11,51	<b>0,27</b>
<b>Inclinación radial (grados)</b>	19,99 ± 4,36	22,76 ± 5,13	<b>0,26</b>
<b>Inclinación volar (grados)</b>	10,8 ± 11,34	18,24 ± 6,65	<b>0,13</b>

Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$ .

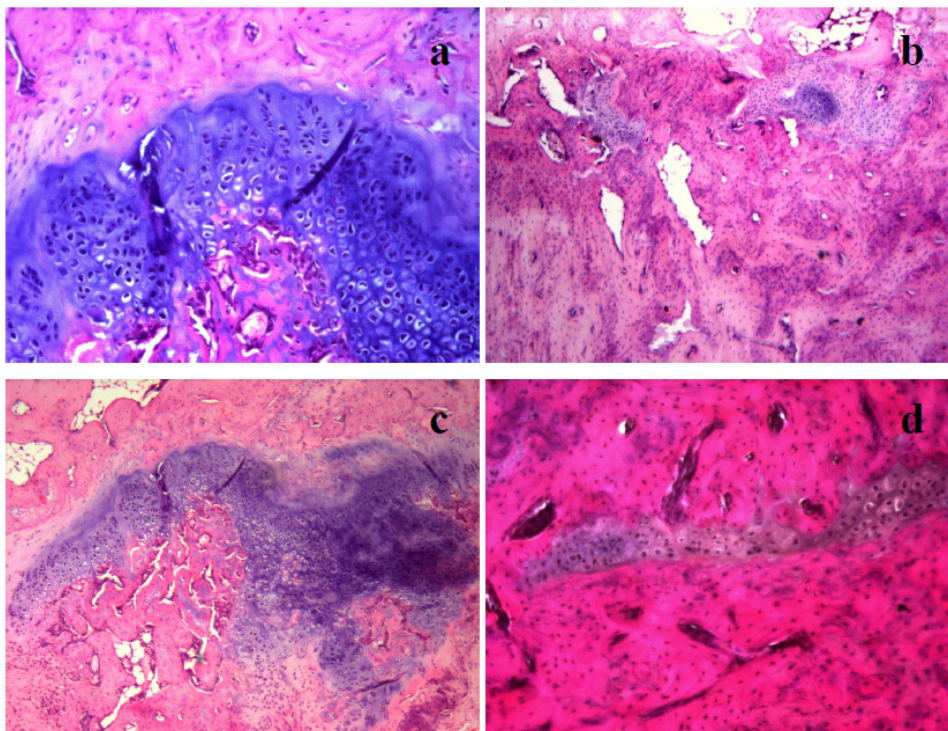
#### 5.4.9.2 Estudio histológico

En todos los casos de este grupo se ha observado fracaso del trasplante de la placa de crecimiento. En algunos casos la placa desaparece, así como el tejido hematopoyético que es sustituido por adipocitos (Fig. 5.43).



**Figura 5.43** (crio + células 12 semanas) Sustitución adiposa de la placa de crecimiento y hueso epúrneo (H-E 4x).

En este grupo, si bien el trasplante de placa ha fracasado, en los casos en los que se observan restos de placa de crecimiento esta se encuentra rodeada de hueso compacto por todos sus lados (Fig. 5. 44 a, b, c y d).



**Figura 5.44** (crio + células 12 semanas) Hueso compacto rodeando restos de la placa de crecimiento a) (H-E 10x). b. c y d) (H-E 4x).

#### 5.4.9.3 Resumen del grupo trasplante de placa crioconservada con administración de células (MSC) de 12 semanas de evolución

En este grupo se observan alteraciones macroscópicas y radiológicas en comparación con el grupo control. En todos los casos de este grupo se ha observado fracaso del trasplante de la placa de crecimiento.

#### 5.4.10 Estudio comparativo entre los grupos de trasplante crioconservado de 6 y 12 semanas con los grupos de trasplante crioconservado con aporte de células de 6 y 12 semanas

##### 5.4.10.1 Estudio comparativo, con y sin células, del trasplante crioconservado de 6 semanas de evolución.

El examen clínico de las extremidades intervenidas revela un aumento de la flexoextensión de la muñeca, mayores grados de extensión del codo y menor diámetro del brazo en el grupo con aporte de células. El resto de los parámetros no presentan diferencias significativas (Tabla XXI).

El examen radiológico muestra diferencias, en el grupo con aporte de células, un aumento de la longitud de la epífisis radial interna y en la anchura fisaria. En el resto de parámetros medidos no se observan diferencias significativas (Fig 5.45 y Tabla XXII).

**Tabla XXI.** Comparación de los parámetros clínicos entre el trasplante en crioconservado de 6 semanas de evolución y el trasplante crioconservado con aporte de células de 6 semanas de evolución.

<b>Trasplante crioconservado 6 semanas</b>	<b>Trasplante crioconservado + células (n=10) (media ± DE)</b>	<b>Trasplante crio (n=7) (media ± DE)</b>	<b>p</b>
<b>Extensión Carpo (grados)</b>	94 ± 6,99	58,57±33,38	<b>0,03*</b>
<b>Flexión Carpo (grados)</b>	95 ± 17,8	70,00±32,15	<b>0,05*</b>
<b>Supinación (grados)</b>	4,4 ±3,47	0,00±7,64	<b>0,12</b>
<b>Pronación (grados)</b>	4,7 ± 3,16	6,43 ±4,76	<b>0,38</b>
<b>Extensión Codo (grados)</b>	-5	-13,57±4,76	<b>0,00*</b>
<b>Flexión Codo (grados)</b>	120	123,57±13,14	<b>0,39</b>
<b>Diámetro antebrazo (mm)</b>	1,85 ± 0,2	1,84±0,21	<b>0,94</b>
<b>Diámetro brazo (mm)</b>	3,68 ± 0,3	4,04±0,24	<b>0,01*</b>

Test de la t de student. \* Significación estadística para p<0,05





**Figura 5.45** Imágenes radiológicas, proyección anteroposterior del antebrazo, perteneciente a ambos grupos con y sin células del grupo trasplante crioconservado de 6 semanas de evolución.

**Tabla XXII.** Comparación de los parámetros radiológicos entre el trasplante en crioconservado de 6 semanas de evolución y el trasplante crioconservado con aporte de células de 6 semanas de evolución.

<b>Trasplante crioconservado 6 semanas</b>	<b>Trasplante crio + células (n=10) (media ± DE)</b>	<b>Trasplante crio (n=7) (media ± DE)</b>	<b>p</b>
<b>longitud cúbito (mm)</b>	22,98 ± 1,36	23,57±1,27	<b>0,41</b>
<b>Longitud radio (mm)</b>	15,09 ± 0,69	14,73±1,26	<b>0,52</b>
<b>Longitud eje proximal radio (mm)</b>	5,52 ± 2,37	6,00±0,65	<b>0,61</b>
<b>Longitud eje distal radio (mm)</b>	7,64 ± 3,19	8,89±1,07	<b>0,38</b>
<b>Longitud fisis radial externa (mm)</b>	0,65 ± 0,17	1,42±1,03	<b>0,07</b>
<b>Longitud fisis radial media (mm)</b>	0,74 ± 0,42	1,29±0,78	<b>0,12</b>
<b>Longitud fisis radial interna (mm)</b>	0,86 ± 0,44	1,62±1,38	<b>0,19</b>
<b>Longitud epífisis radial externa (mm)</b>	1,52 ± 0,22	1,07±0,30	<b>0,08</b>
<b>Longitud epífisis radial interna (mm)</b>	1,21 ± 0,54	0,67±0,31	<b>0,04*</b>
<b>Anchura metáfisis radial (mm)</b>	2,08 ± 0,19	1,89±0,47	<b>0,32</b>
<b>anchura fisis proximal (mm)</b>	2,04 ± 0,16	1,65±0,46	<b>0,05*</b>
<b>anchura fisis distal (mm)</b>	2,1 ± 0,2	1,53±0,26	<b>0,01*</b>
<b>Anchura epífisis media (mm)</b>	1,98 ± 0,3	1,76±0,28	<b>0,19</b>
<b>Ángulo metafisario(grados)</b>	24,45 ± 4,54	22,22±12,33	<b>0,6</b>
<b>Ángulo diáfisis/epífisis (grados)</b>	161,82 ± 5,13	169,84±5,13	<b>0,52</b>
<b>Arco radial máximo (grados)</b>	206,38 ± 26,68	203,46±49,29	<b>0,71</b>
<b>Inclinación radial (grados)</b>	22,36 ± 6,9	11,92±13,73	<b>0,09</b>
<b>Inclinación volar (grados)</b>	12,99 ± 0,77	0,32±14,52	<b>0,11</b>

Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$ .



#### 5.4.10.2 Estudio comparativo, con y sin células, del trasplante crioconservado de 12 semanas de evolución.

El examen clínico de las extremidades intervenidas revela un aumento del diámetro del antebrazo y una disminución del diámetro del brazo en el grupo con aporte de células. El resto de los parámetros no presentan diferencias significativas (Tabla XXIII).

El examen radiológico muestra una mejor inclinación radial en el grupo con aporte de células. En el resto de parámetros medidos no se observan diferencias significativas (Fig 5.46 y Tabla XXIV).

**Tabla XXIII.** Comparación de los parámetros clínicos entre el trasplante en crioconservado de 12 semanas de evolución y el trasplante crioconservado con aporte de células de 12 semanas de evolución.

<b>Trasplante criopreservado 12 semanas</b>	<b>Trasplante crioconservado + células (n=8) (media ± DE)</b>	<b>Trasplante crioconservado (n=12) (media ± DE)</b>	<b>p</b>
<b>Extensión Carpo (grados)</b>	85,12 ± 30,82	79,38±12,66	<b>0,59</b>
<b>Flexión Carpo (grados)</b>	81 ± 23,68	76,88±9,61	<b>0,95</b>
<b>Supinación (grados)</b>	3,11 ± 3,48	2,50±2,67	<b>0,3</b>
<b>Pronación (grados)</b>	6,44 ± 5,12	3,13±3,72	<b>0,07</b>
<b>Extensión Codo (grados)</b>	-5	-6,25±2,31	<b>0,2</b>
<b>Flexión Codo (grados)</b>	120	120,00± 0	<b>**</b>
<b>Diámetro antebrazo (mm)</b>	2,3 ± 0,21	2,00 ±0,16	<b>0,008*</b>
<b>Diámetro brazo (mm)</b>	4,33 ± 0,34	4,71±0,20	<b>0,04*</b>

Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$ . \*\*No puede calcularse T porque las desviaciones típicas de ambos grupos son 0.



**Figura 5.46** Imágenes radiológicas, proyección anteroposterior del antebrazo, perteneciente a ambos grupos con y sin células del grupo trasplante crioconservado de 12 semanas de evolución.

**Tabla XXIV.** Comparación de los parámetros radiológicos entre el trasplante en crioconservado de 12 semanas de evolución y el trasplante crioconservado con aporte de células de 12 semanas de evolución.

<b>Trasplante crioconservado 12 semanas</b>	<b>Trasplante crio + células (n=8) (media ± DE)</b>	<b>Trasplante crio (n=12) (media ± DE)</b>	<b>p</b>
<b>longitud cúbito (mm)</b>	24,38 ± 1,77	23,75±1,65	<b>0,79</b>
<b>Longitud radio (mm)</b>	15,95 ± 0,79	14,82±0,73	<b>0,09</b>
<b>Longitud eje proximal radio (mm)</b>	7,02 ± 0,91	6,09±0,77	<b>0,18</b>
<b>Longitud eje distal radio (mm)</b>	8,72 ± 1,37	8,86±0,77	<b>0,7</b>
<b>Longitud fisis radial externa (mm)</b>	0,92 ± 0,53	0,36±0,41	<b>0,48</b>
<b>Longitud fisis radial media (mm)</b>	0,64 ± 0,32	0,24±0,26	<b>0,41</b>
<b>Longitud fisis radial interna (mm)</b>	0,85 ± 0,51	0,31±0,36	<b>0,9</b>
<b>Longitud epífisis radial externa (mm)</b>	1,31 ± 0,33	1,55±0,22	<b>0,96</b>
<b>Longitud epífisis radial interna (mm)</b>	0,88 ± 0,58	1,21±0,23	<b>0,42</b>
<b>Anchura metáfisis radial (mm)</b>	2,25 ± 0,23	2,15±0,49	<b>0,16</b>
<b>anchura fisis proximal (mm)</b>	2,27 ± 0,29	2,34±0,35	<b>0,5</b>
<b>anchura fisis distal (mm)</b>	2,21 ± 0,4	2,27±0,32	<b>0,83</b>
<b>Anchura epífisis media (mm)</b>	2,02 ± 0,32	2,16±0,17	<b>0,61</b>
<b>Ángulo metafisario(grados)</b>	94,19 ± 4,9	97,69±28,23	<b>0,35</b>
<b>Ángulo diáfisis/epífisis (grados)</b>	159,36 ± 10,7	158,26±4,79	<b>0,82</b>
<b>Arco radial máximo (grados)</b>	204,4 ± 15,01	208,28±68,32	<b>0,42</b>
<b>Inclinación radial (grados)</b>	19,99 ± 4,36	12,94±6,96	<b>0,02*</b>
<b>Inclinación volar (grados)</b>	10,8 ± 11,34	6,59±14,67	<b>0,26</b>

Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$ .

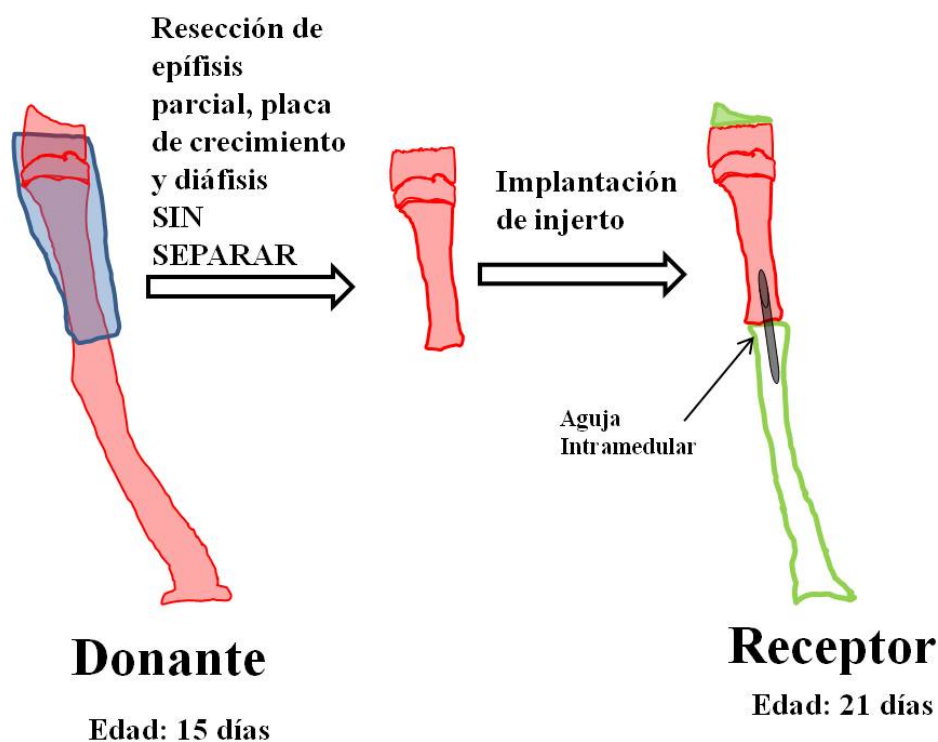
## 5.5 OBJETIVO 2. ALOTRASPLANTE COMBINADO DE PLACA DE CRECIMIENTO Y HUESO

### Resultados del segundo modelo experimental, aloinjertos óseos con trasplante de placa de crecimiento

Dado que el trasplante de placa de crecimiento avascular aislado no consigue solucionar el problema al que nos enfrentamos en la clínica se decide desarrollar un nuevo modelo experimental en el que se combina el trasplante de placa de crecimiento con aloinjerto óseo.

#### 5.5.1 Trasplante de epífisis (parcial), placa de crecimiento metáfisis y diáfisis (parcial), sin separar (grupo E)

En este grupo se ha realizado un trasplante completo que incluye parte proximal de la epífisis (se respeta la región articular), la placa de crecimiento, metáfisis y el tercio distal de la diáfisis del radio. La intervención es realizada en ratas de 1 mes de edad y el injerto procede de ratas de 15 días de edad. El injerto realizado es fresco (Esquema 6).



**Esquema 6.** Esquema de la intervención Resección de epífisis parcial, placa de crecimiento y diáfisis sin separar.

### 5.5.1.1 Estudio clínico y radiológico

En el examen macroscópico de las extremidades intervenidas se observa la presencia de una extremidad acortada respecto a la contralateral y la presencia de mano zamba radial en el 37,5% de los casos.

En el estudio radiológico a las 12 semanas se observa la presencia de epífisis en todos los casos aunque ésta es de menor tamaño que una epífisis normal. La región de la placa de crecimiento presenta radiotransparencia en un 75% de los casos (6 de 8) y ésta es compatible con la presencia de placa de crecimiento en un 37,5 % (3 de 8), la placa se encuentra al mismo nivel que el cúbito en el 25% de los casos (2 de 8) y es menor en el 25% de los casos (2 de 8). Es constante la presencia de puentes óseos entre el radio y el cúbito a nivel distal (Fig 5.47).

El injerto ha consolidado en todos los casos y es viable, únicamente se observan áreas de lisis parcial en 2 casos.

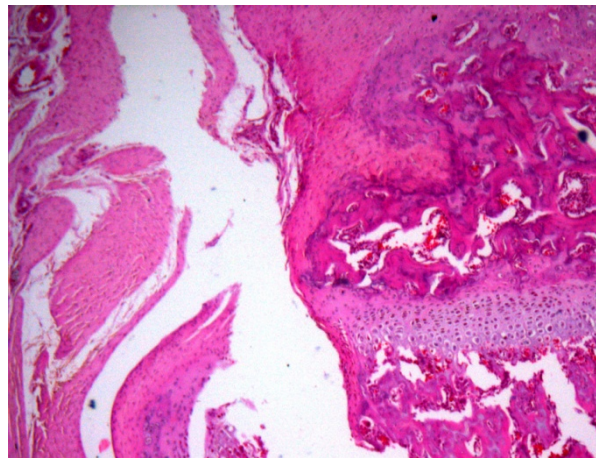
En un caso (E2) se observa la presencia de una banda radiotransparente que atraviesa la placa de epífisis a metáfisis y en otro caso (E4) la epífisis presenta zonas radio opacas compatibles con necrosis.



**Figura 5.47** Imagen radiológica, proyección anteroposterior del antebrazo, perteneciente al grupo E, trasplante completo de epífisis (parcial), placa, metáfisis y diáfisis.

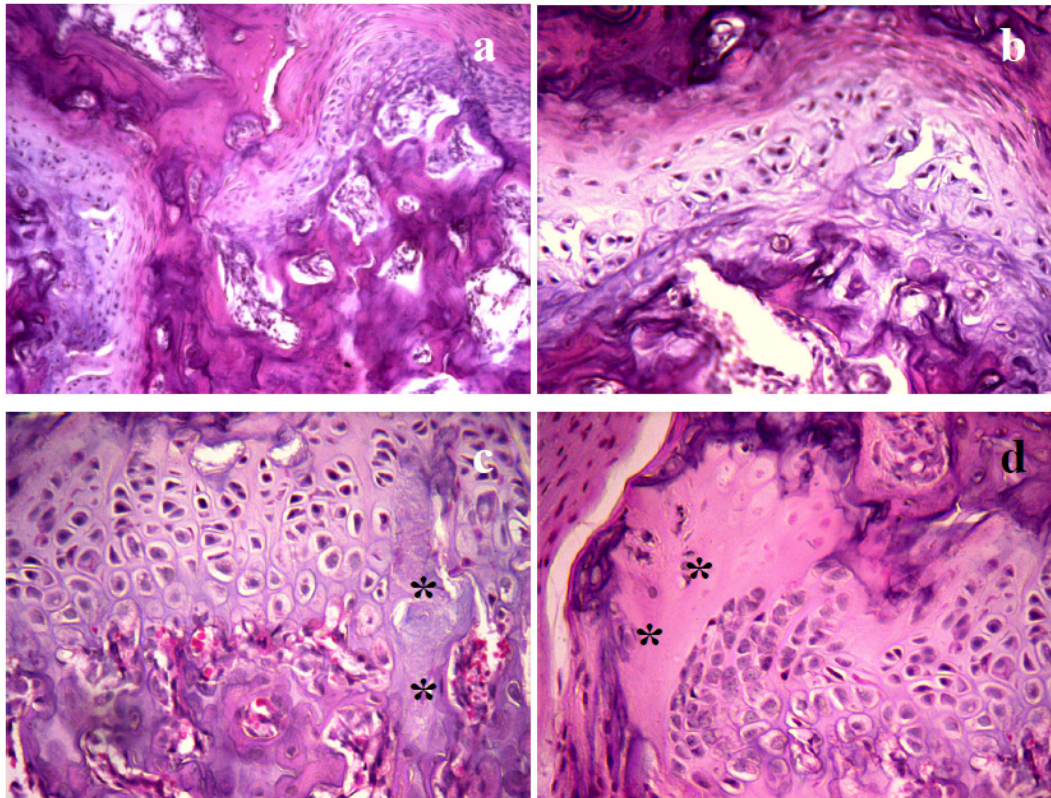
### 5.5.1.2 Estudio histológico

En todos los casos se pierde la arquitectura del injerto. En un caso se ha observado la epífisis de forma parcial (Fig. 5.48), en el que se ha observado el callo de tejido pericondral entre el lecho y el injerto, así como cierta persistencia del hueso trabecular epifisario de ambas epífisis. En otro caso en el que se ha observado la placa de crecimiento completa, esta ha perdido la arquitectura normal, y se aprecia un puente óseo central (Fig. 5.49a), en la que se observa la pérdida de la metáfisis, siendo sustituida por gruesas trabéculas ósea, y pérdida completa del tejido hematopoyético. Aunque la placa de crecimiento se destruye en casi todos los casos, en los que quedan restos de células (Fig. 5.49b), en algunos casos persiste restos de placa con necrosis central (Fig. 5.49c), o necrosis periféricas (Fig. 5.49d).



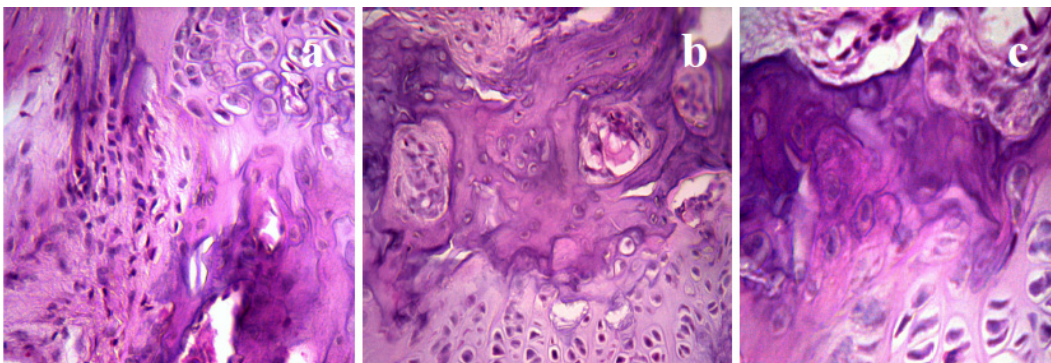
**Figura 5.48** (Grupo E) Epífisis con presencia de callo de tejido pericondral entre el lecho y el injerto (H-E 4x).





**Figura 5.49** (Grupo E) a) Placa de crecimiento trasplantada con puente óseo central (H-E 10x). b) Restos celulares de la placa de crecimiento H-E 20x. c) Placa de crecimiento trasplantada con pérdida de la arquitectura normal y necrosis central \* (H-E 20x). d) Placa de crecimiento pérdida de la arquitectura de la zona germinativa y proliferativa y necrosis marginal \* (H-E 20x).

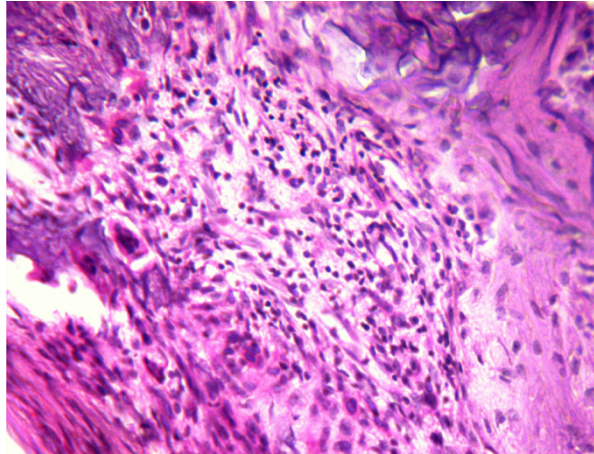
Anillo pericondral: pierde su arquitectura normal, aparece con fibrosis (Fig. 50a).



**Figura 5.50** (Grupo E) a) Fibrosis del anillo pericondral (H-E 20x). b) Hueso supra-placa de apariencia abigarrada (H-E 20x). c) Hueso supra-placa con células de hábito condral (H-E 40x).

Hueso supra-placa: Aparece abigarrado (Fig. 5.50b), en algunos casos se observan células de hábito condral en la zona de hueso inmaduro (Fig. 5.50c).

Médula ósea: carece de tejido hematopoyético, es sustituida por tejido fibroso, un patrón de células de carácter inflamatorio, y abundantes células gigantes multinucleadas (Fig. 5.51).



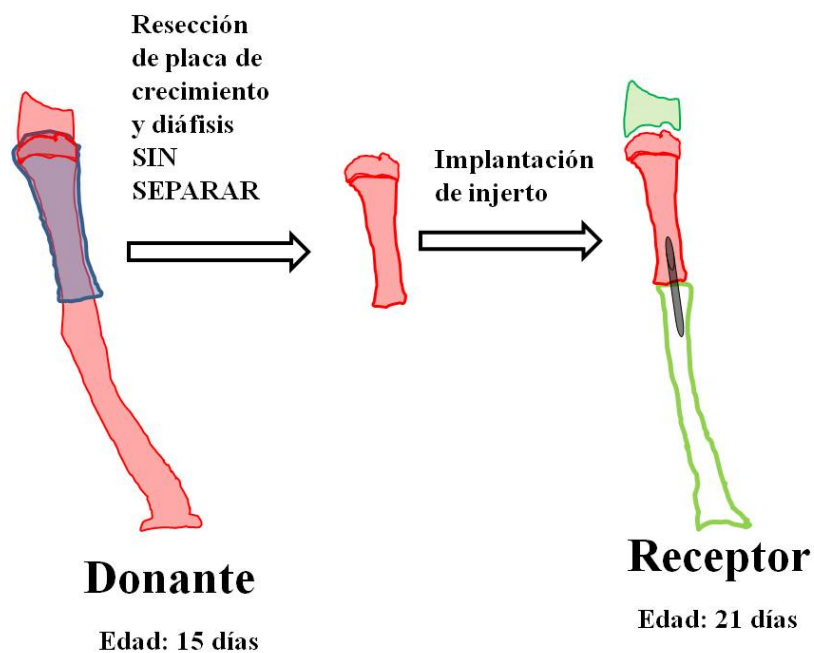
**Figura 5.51** (Grupo E) Médula ósea con sustitución fibrosa (H-E 20x).

#### **5.5.1.3 Resumen del grupo trasplante de epífisis (parcial), placa de crecimiento metáfisis y diáfisis (parcial), sin separar (grupo E)**

En todos los casos se pierde la arquitectura del injerto. La placa de crecimiento se destruye en todos los casos, y el anillo pericondral pierde la arquitectura normal y aparece con fibrosis. El Hueso supra-placa aparece abigarrado.

#### **5.5.2 Trasplante de placa de crecimiento con metáfisis y diáfisis (parcial) sin separar (Grupo G)**

Se realiza un trasplante de placa con tejido óseo subcondral y metáfisis y diáfisis, sin separar, en ratas hembra de 21 días de edad (esquema 7).



**Esquema 7.** Esquema de la intervención trasplante de placa de crecimiento y diáfisis sin separar en fresco.

#### 5.5.2.1 Estudio clínico y radiológico

Este grupo se caracteriza por la lisis completa del injerto en todos los casos (Fig 5.52).

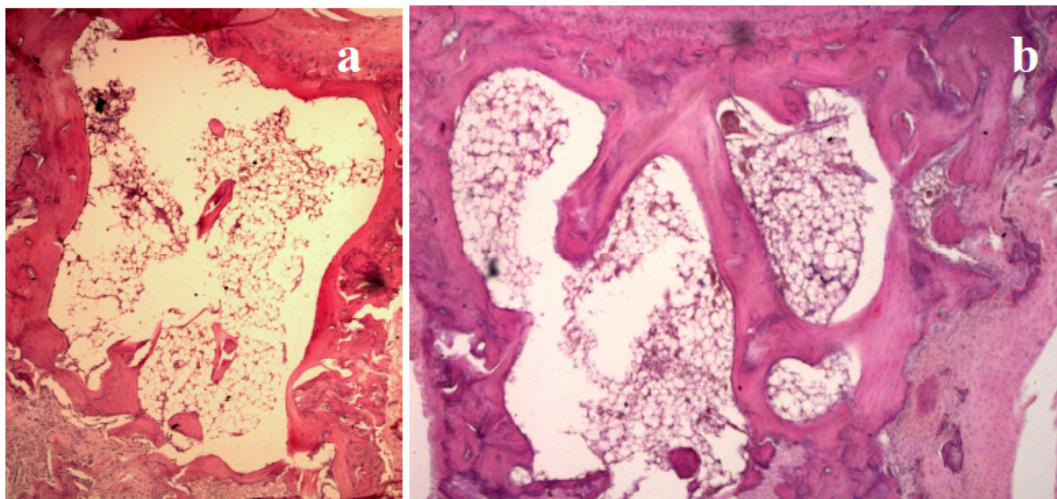


**Figura 5.52** Imagen radiológica, proyección anteroposterior del antebrazo, perteneciente al grupo G. Trasplante de placa con metáfisis y diáfisis sin separar.



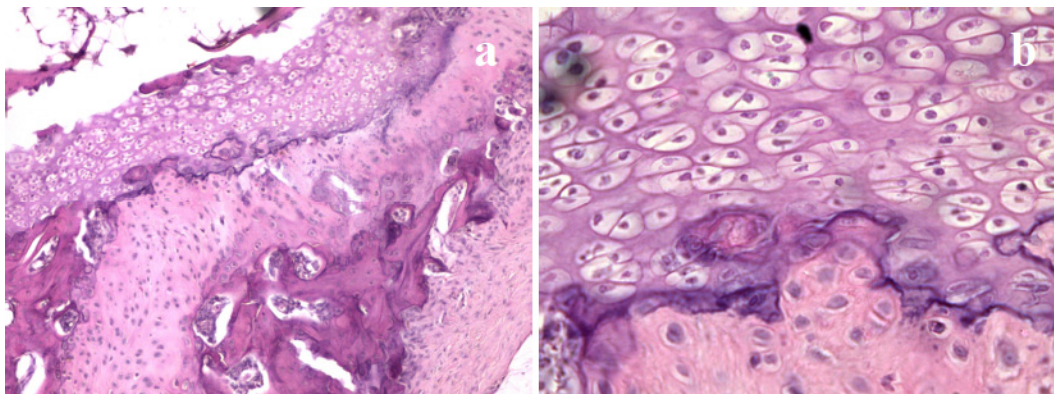
### 5.5.2.2 Estudio histológico

En todos los casos se pierde la arquitectura del injerto. La epífisis del radio persiste, pero muy alterada. La epífisis se observa de mayor tamaño que la normal, con reforzamiento de las paredes ósea de ambos bordes laterales, que aparecen con un mayor grosor del componente de hueso lamelar, interno, y del hueso inmaduro que aparece en la zona externa. Las trabéculas de la epífisis no se observan, en algunos casos (Fig. 5.53 a); y en otros, se observan trabéculas muy gruesas, que en ocasiones parten del hueso subcondral de la cara articular de la epífisis y se dirigen hacia los bordes laterales (Fig 5.53 b). El tejido hematopoyético de la epífisis se pierde y es sustituido por tejido graso, adipocitos. La epífisis por sus bordes laterales se encuentra rodeada por un tejido fibroconjuntivo denso.



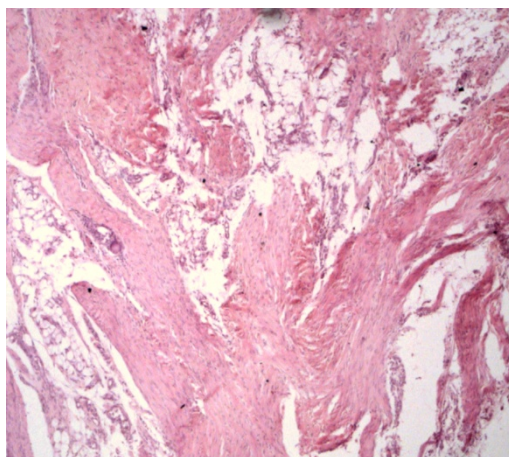
**Figura 5.53** (Grupo G) a) Ausencia de trabéculas epifisarias (H-E 4x). b) Escasa presencia de trabéculas epifisarias (H-E 4x).

En algunos casos persisten restos de placa de crecimiento (Fig. 5.54a); en otros casos, se observan restos de placa con restos de hueso de la diáfisis (Fig. 5.54b).



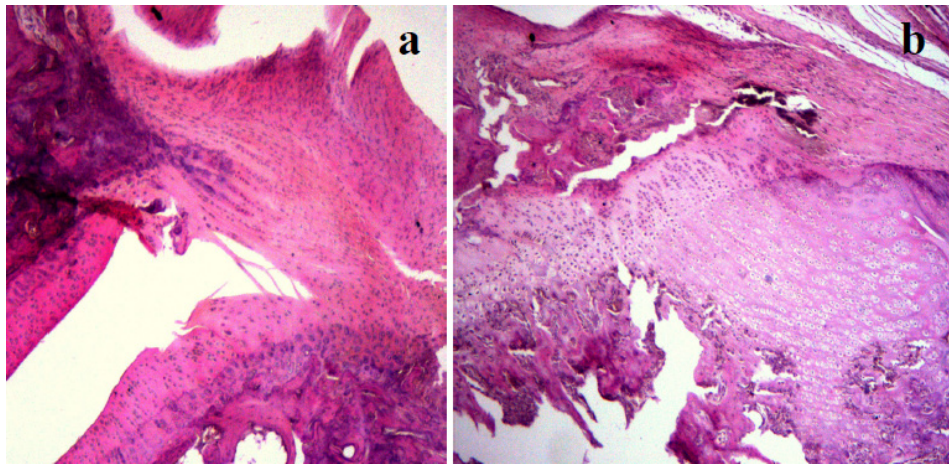
**Figura 5.54** (Grupo G) a) Restos de placa de crecimiento (H-E 10x). b) Restos de placa de crecimiento y hueso diafisario (H-E 40x).

El hueso de la diáfisis, el otro componente del injerto, desaparece casi en todos los casos; su espacio es ocupado por tejido conjuntivo, en algunas preparaciones se observan restos de tejido muscular intercalado; también se observan restos de tejido hematopoyético con necrosis, que es sustituido por tejido graso (Fig.5.55).



**Figura 5.55.** (Grupo G) Restos de hueso diafisario del injerto (H-E 4x).

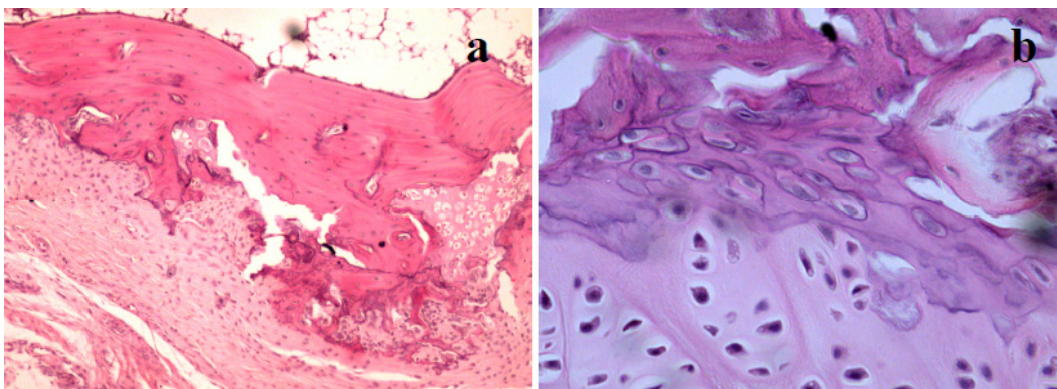
A la lesión del radio le acompaña otra lesión en el cúbito por tracción del ligamento radio-cubital. En primer lugar se observa la persistencia del ligamento radio-cubital distendido (Fig. 5.56a); y, en la placa de crecimiento del cúbito se observa un aumento de la celularidad en la zona hipertrófica, conservando la metáfisis una morfología similar a la normal (Fig. 5.56b).



**Figura 5.56** (Grupo G) a) Distensión del ligamento radio-cubital c (H-E 10x). b) Aumento de celularidad en la zona hipertrófica de la placa de crecimiento del cúbito. (H-E 10x).

#### Hueso supra-placa

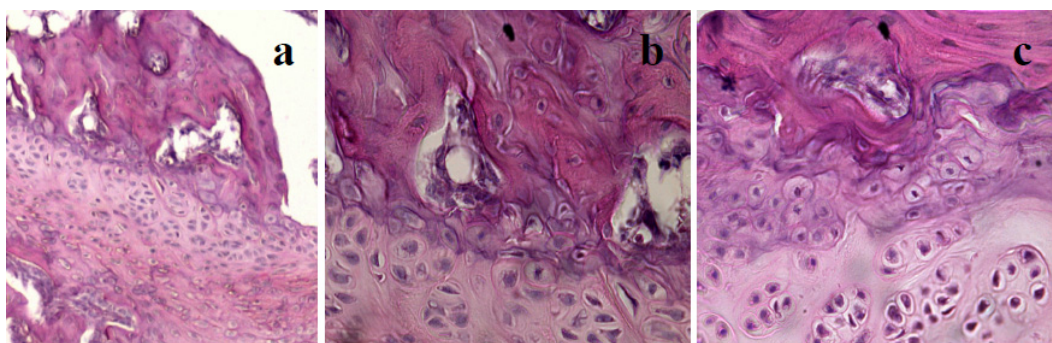
El hueso supra-placa de la epífisis de pierde en casi todos los casos. En ocasiones se aprecia restos de hueso supra-placa sobre restos de placa necrosada del mismo sobre restos, no viables, de la placa de crecimiento (Fig.5.57a); en estos casos predomina el componente de hueso lamelar del hueso supra-placa. En algunos casos se han observado restos de placas, aparentemente viables, en los que no se observa zona germinativa; sin embargo, por encima de la zona del proliferativo aparece un área de tejido basófilo, separada de esta zona por una línea basófila muy intensa. En esta área se observan células similares a las de la zona germinativa, que de forma progresiva cambian su fenotipo de lagunas redondas o discretamente ovaladas a lagunas muy ovaladas, similares a las del tejido óseo; algunas de estas células acaban inmersas en una matriz, aparentemente compatible con matriz ósea (Fig.5.57b).



**Figura 5.57** (Grupo G) a) Restos de hueso supra-placa (H-E 10x). b) Placa de crecimiento y hueso supraplaca (H-E 40x).



En algunos casos en los que se ha observado restos de placa de crecimiento, aparentemente viable pero no funcional, se ha observado como en ambos lados, epifisario y metafisario, aparece un tejido óseo que rodea de forma parcial a la placa (Fig. 5.58a). Sobre el lado epifisario de la placa aparece una zona de tejido óseo, que de forma aparente se asemeja a un hueso supra-placa; sin embargo, siempre se mantiene una separación entre el tejido óseo y el condral (Fig. 5.58b), esta observación se ha realizado en otras preparaciones similares (Fig. 5.58c).



**Figura 5.58** (Grupo G) a) Tejido óseo que rodea a la placa (H-E 10x). b) Zona de tejido óseo sobre el lado epifisario (H-E 40x). c) Zona de tejido óseo sobre el lado epifisario (H-E 40x).

#### **Respuesta de la cortical normal como respuesta a las alteraciones producidas en el radio durante los trasplantes.**

A lo largo de esta exposición, centrada siempre en la placa de crecimiento se han observado distintas respuestas de la cortical normal del radio a la acción quirúrgica sobre la placa de crecimiento. De modo esquemático, se pueden describir varias fases:

Fase I. Hueso normal (Fig. 5.59a); constituido por hueso lamelar, por el que discurren vasos. Los osteocitos se encuentran en lagunas ovaladas entre el hueso lamelar. Los vasos se acompañan de células periféricas.

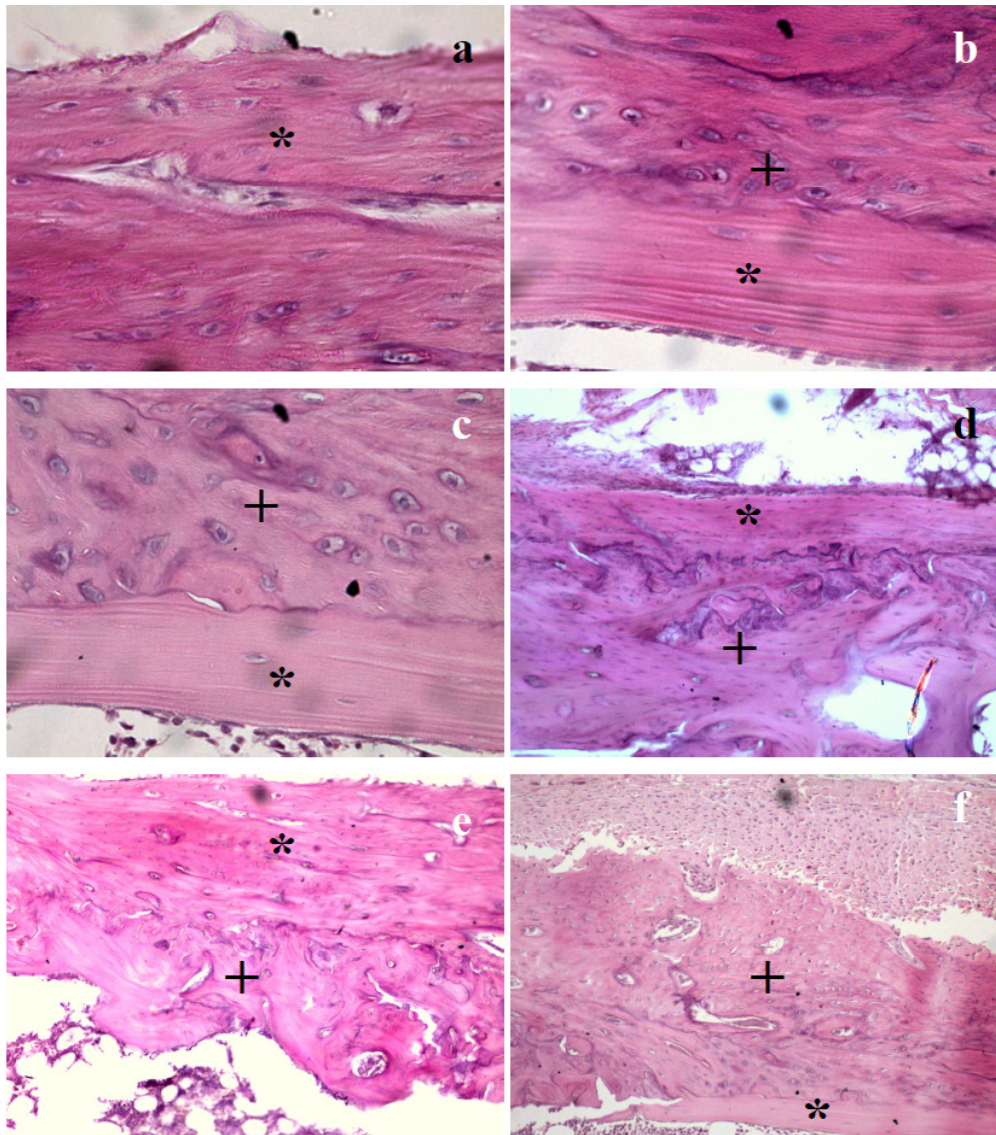
Fase II. Primera fase de lesión (Fig. 5.59b). Los osteocitos en la región central de la cortical aumentan en cantidad, las lagunas tienden a ser irregulares

o redondas. Entre la zona central y las zonas laterales de la cortical se aprecia una banda basófila hipercromática. Los núcleos de estas células son de morfología irregular; también se observa que los núcleos de los osteocitos normales, en los márgenes laterales, aumentan de tamaño con respecto a la laguna osteocítica. La matriz extracelular es irregular, pero mantiene su eje longitudinal con respecto a la cortical.

Fase III. En la región central de la cortical tanto los núcleos celulares como las laguna óseas adquieren morfología irregular (Fig. 5.59c). La matriz extracelular es irregular, con áreas hipocromáticas, y pierde su eje con respecto a los márgenes de la cortical. La zona lamelar se delimita con claridad de la zona central.

Fase IV. La zona central de la cortical es muy irregular, con imágenes de neoformación ósea abundante (Fig.5.59d).

Fase V. Fase final, en la que la neoformación de hueso extravasa en la cortical interna (Fig. 5.59e) o la cortical externa del hueso (Fig. 5.59f), en la que participa el hueso nuevo formado por el periostio. En ocasiones en el hueso neoformado quedan incluido restos de hueso de la cortical (Fig. 5.59f).

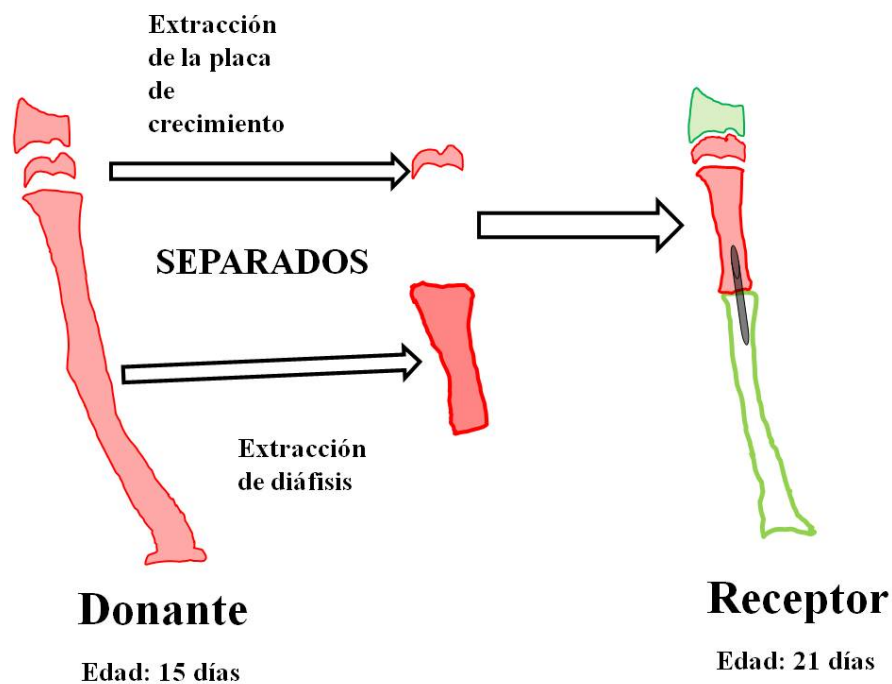


**Figura 5.59** (Grupo G) Fases de respuesta de la cortical normal del radio a) Fase I (H-E 40x). b) Fase II (H-E 40x). c) Fase III (H-E 20x). d) Fase IV. e) Fase V (H-E 10x). f) Fase V (H-E 10x). Fase V (H-E 10x). Hueso lamelar \*. Hueso inmaduro +.

### 5.5.2.3 Resumen del grupo trasplante de placa de crecimiento con metáfisis y diáfisis (parcial) sin separar (Grupo G)

Este grupo se caracteriza por la lisis completa en todos los casos del injerto y la diáfisis. La epífisis del radio persiste, pero muy alterada, con mayor tamaño que la normal. El hueso supra-placa de la epífisis se pierde en casi todos los casos.

### 5.5.3 Trasplante de placa de crecimiento, metáfisis y diáfisis (parcial) ambos separados del mismo donante (Grupo F) (esquema 8)



**Esquema 8.** Esquema de la intervención Trasplante de placa de crecimiento, metáfisis y diáfisis (parcial) ambos separados.

#### 5.5.3.1 Estudio clínico y radiológico

En los casos analizados (n=7) (Fig 5.60) (esquema se observa la presencia de epífisis en todos los casos, pero el tamaño de ésta es menor en todos los casos. En la zona de la fisis se observa una zona radiotransparente en el 28% de los casos (n=2). En estos dos casos la altura de esta zona de radio transparencia respecto al cúbito es mayor. En la zona de la diáfisis se observa hueso en un 42% de los casos (n=3), y se observa imagen radiológica compatible con lisis completa del injerto en un 58% de los casos (n=4).

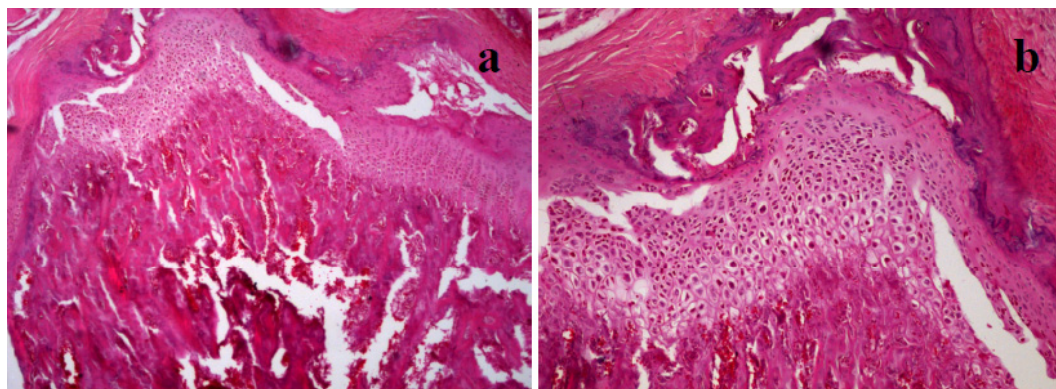




**Figura 5.60** Imagen radiológica, proyección anteroposterior del antebrazo, perteneciente al grupo F, aloinjerto de placa de crecimiento y hueso del mismo donante separados.

### 5.5.3.2 Estudio histológico

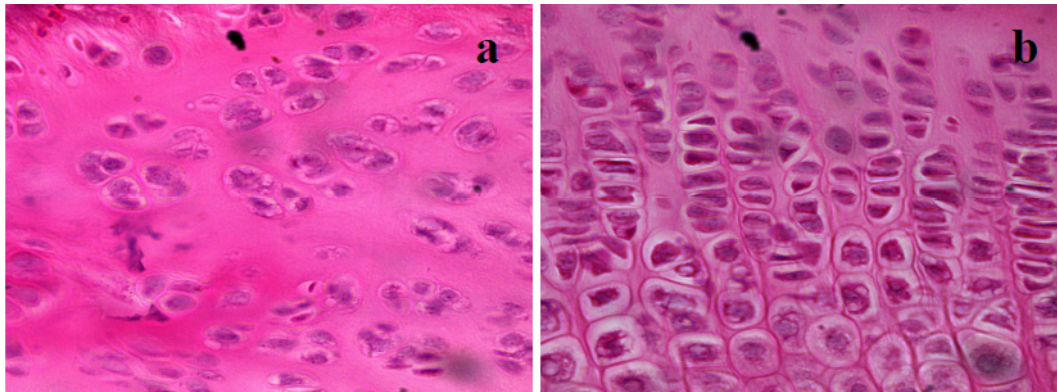
En todos los casos se observa la arquitectura distal del radio trasplantado alterada; sólo en algunos casos se observa diáfisis del radio. Las epífisis se observan muy alteradas. La placa de crecimiento, en los casos que se observa, tiene alterada su arquitectura de columnar, y aparece parcialmente rota, aunque conserva una arquitectura tisular dentro de la normalidad. (Fig. 5.61 a y b).



**Figura 5.61** (Grupo F) a) Placa de crecimiento con alteración de la arquitectura del tejido (H-E 4x).b) Placa de crecimiento con alteración de la arquitectura de las columnas (H-E 10x).



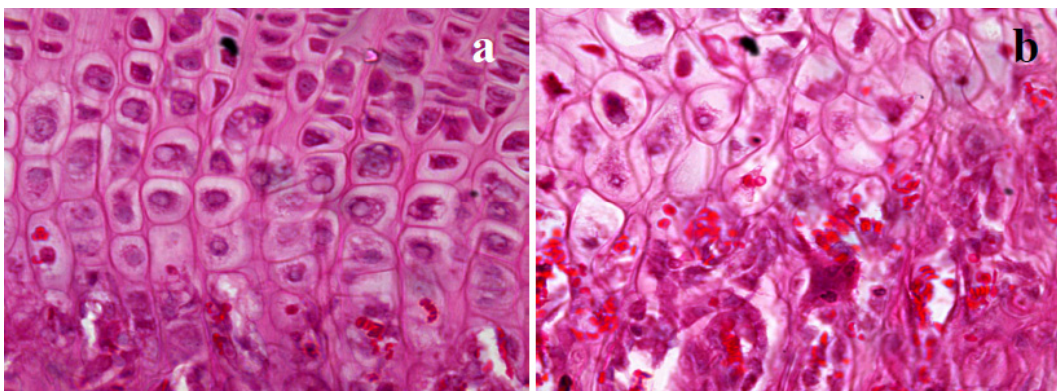
**Zona germinativa.** Cuando se encuentra placa en los especímenes, la zona germinativa contiene células con un fenotipo dentro de la normalidad; es ocasiones las células del germinativo aumentan en número con respecto al control (Fig 5.62a).



**Figura 5.62** (Grupo F) a) Zona del germinativo donde se observan células con un fenotipo dentro de la normalidad (H-E 40x). b) Zona del proliferativo con patrón dentro de la normalidad (H-E 40x).

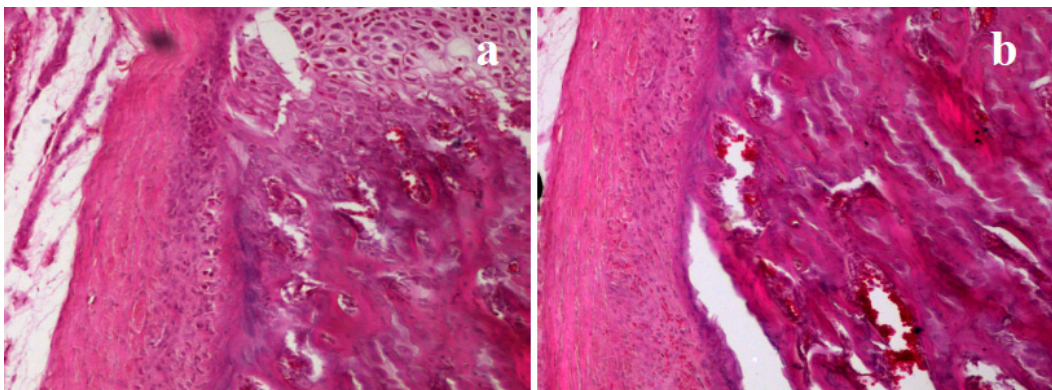
**Zona del proliferativo.** Tiene un patrón de normalidad en cuanto a columnas de células y de células por columna. En algunos casos se ha observado gran actividad celular en las primeras células del proliferativo, como se observa por el gran aumento de nucleolos en estas células (Fig. 5.62b).

**Zona del hipertrófico.** Se observa una arquitectura dentro de la normalidad. (Fig. 5.63a). En la zona condro-ósea se observa también un patrón de normalidad con presencia de vasos que llegan a las lagunas vacías, en la que se observan hematíes en “pilas de monedas” (Fig. 5.63b).



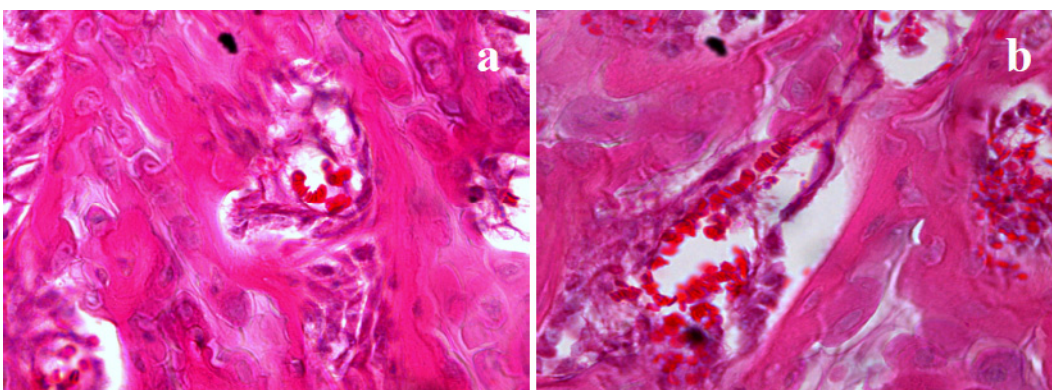
**Figura 5.63** (Grupo F) a) Zona del hipertrófico con arquitectura normal (H-E 40x). b) Unión condro-ósea (H-E 40x).

**Anillo pericondral.** En el anillo pericondral se observan gran número de células de tipo fibroblástico y barra ósea irregular (Fig. 5.64a). El anillo pericondral está cubierta por una gruesa capa de tejido fibroso. (Fig. 5.64b).



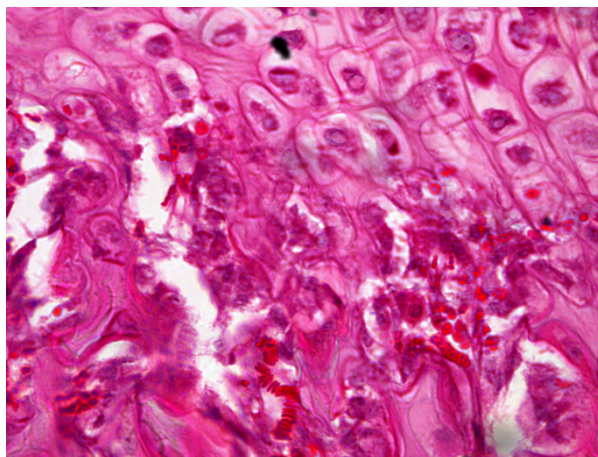
**Figura 5.64** (Grupo F) a) Anillo pericondral con gran número de células y barra ósea irregular (H-E 10x). b) Capa de tejido fibroso que cubre el anillo pericondral (H-E 10x).

**Metáfisis.** En la metáfisis se observan trabéculas condrales, con escasos o ningún ribete osteoblásticos, sí se observan vasos entre las trabéculas (Fig. 5.65 a y b). Se observa un patrón de escasas células de carácter inflamatorio, polimorfonucleares (Fig. 5.66). Las trabéculas metafisarias tienen un patrón morfológico muy irregular (Fig. 5.67 a y b). Estas trabéculas confluyen en la diáfisis con hueso procedente al parecer, del injerto óseo (Fig. 5.68).

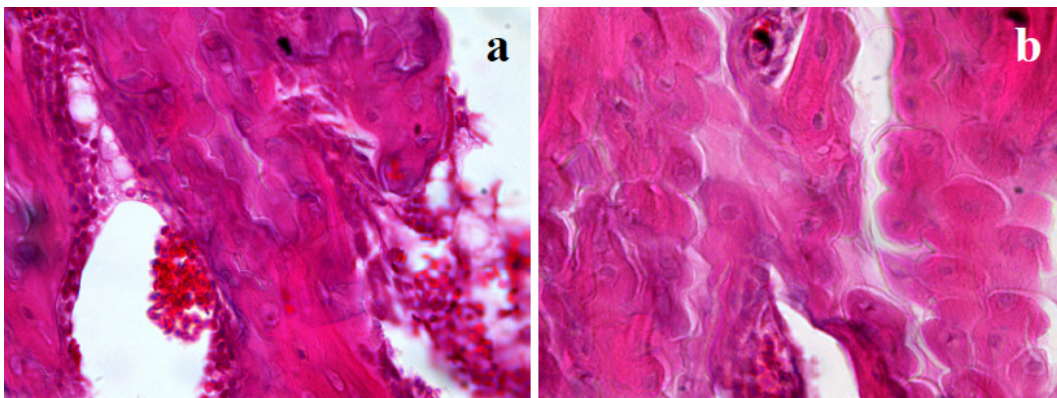


**Figura 5.65** (Grupo F) a) Trabéculas condrales metafisarias con escasos ribetes de osteoblastos (H-E 40x). b) Trabéculas condrales metafisarias con presencia de vasos en disposición de "pilas de monedas" (H-E 40x).

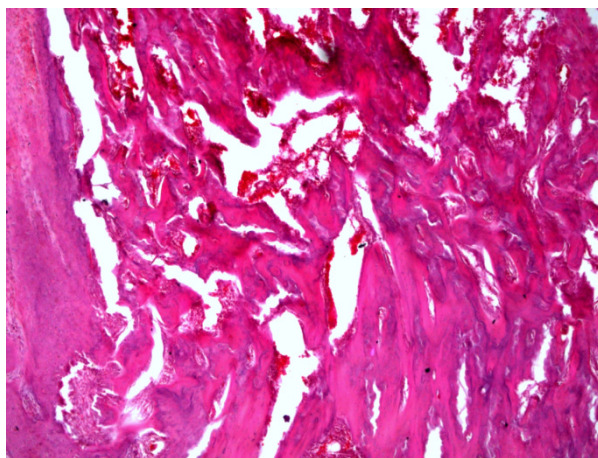




**Figura 5.66** (Grupo F) Trabéculas condrales zona condrometafisaria. Se observa un patrón con escasas células de carácter inflamatorio (H-E 40x).

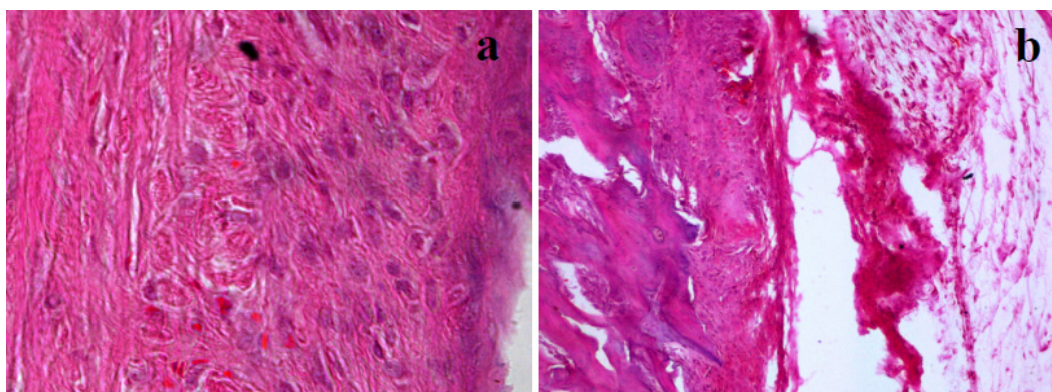


**Figura 5.67** (Grupo F) a) Trabéculas metafisarias con patrón morfológico irregular (H-E 40x). b) Trabéculas metafisarias con patrón morfológico irregular (H-E 40x).



**Figura 5.68** (Grupo F) Zona de unión con el injerto metafiso-diafisario (H-E 4x).

La cortical metafisaria se encuentra ausente en el inicio, en su lugar se observa una banda de tejido fibroconjuntivo (Fig. 5.69 a y b). En algunas zonas, más próximas a la diáfisis, se forma una estructura irregular de hueso maduro e inmaduro. En ningún corte se observa tejido hematopoyético, este es sustituido por un tejido fibroconjuntivo en el que se encuentran inmersas células de carácter inflamatorio, en el que se observan tanto células polimorfonucleares como células mononucleadas, como también se observa en el hueso del lecho.

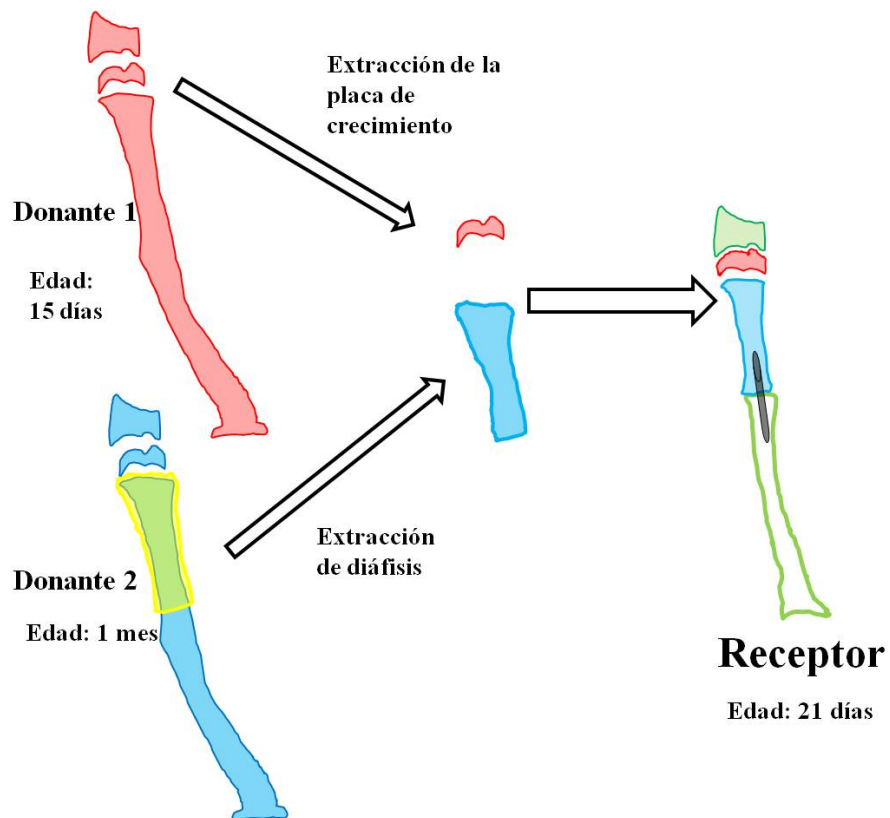


**Figura 5.69** (Grupo F) a) Tejido conjuntivo en la cortical metafisaria, (H-E 40x). b) La cortical metafisaria fibrosada (H-E 10x).

#### **5.5.3.3 Resumen del grupo trasplante de placa de crecimiento, metáfisis y diáfisis (parcial) ambos separados (Grupo F) del mismo donante**

En este grupo se observa la presencia de epífisis de menor tamaño de lo normal. La arquitectura distal del radio trasplantado se encuentra alterada. La placa de crecimiento aparece parcialmente rota, aunque conserva una arquitectura tisular dentro de la normalidad. La zona germinativa contiene células con un fenotipo dentro de la normalidad, el proliferativo y el hipertrófico tienen un patrón de normalidad. El anillo pericondral presenta gran número de células y una barra ósea irregular.

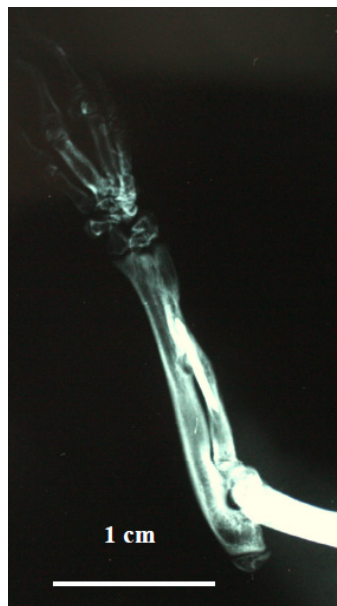
#### 5.5.4 Trasplante de placa de crecimiento y diáfisis (parcial) ambos separados de distintos donantes (Grupo C-A) (Esquema 9)



**Esquema 9.** Esquema de la intervención trasplante de placa de crecimiento con distintos donantes de placa y hueso (C-A).

##### 5.5.4.1 Estudio radiológico

En este grupo se ha realizado un trasplante de hueso y placa con distintos donantes en ratas de 1 mes de edad: se realiza un trasplante de placa de crecimiento procedente de una rata de 15 días de edad y de un aloinjerto metáfiso-diafisario de rata de 1 meses de edad.



**Figura 5.70** Imagen radiológica, proyección anteroposterior del antebrazo, perteneciente al grupo C-A trasplante de hueso y placa, procedentes ambos de distintos donantes.

En todos los casos se conserva la epífisis y ésta es mayor con respecto al control. A nivel de la placa existe una región radiotransparente que se corresponde con la presencia de placa de crecimiento viable. La altura de la placa es menor respecto al cúbito. Únicamente se detectan puentes óseos radiocubitales distales en el 42% de los casos (3 de 8), siendo éstos de menor tamaño que en el resto de grupos. En un caso se observa una sinóstosis radiocubital distal. El injerto óseo ha consolidado en todos los casos y se observan pequeñas zonas líticas a nivel del injerto en el 42% de los casos (3 de 8).

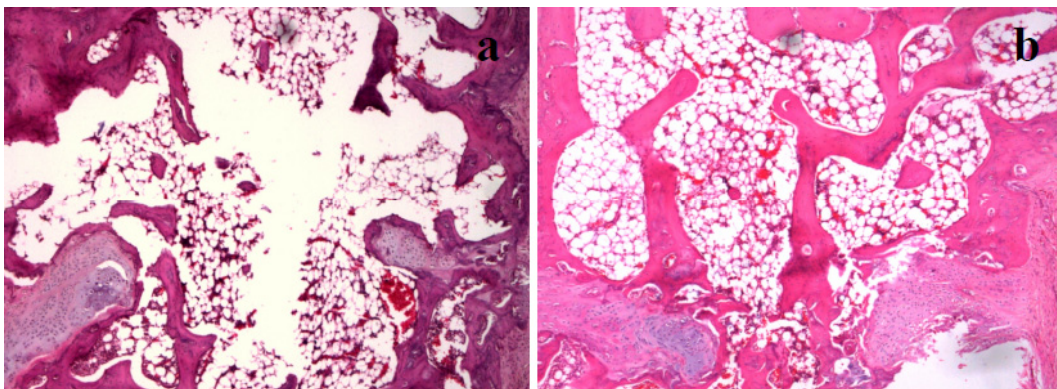
En los casos en los que se ha utilizado injerto fresco de diáfisis radial (Grupo C-A) se observa una alineación macroscópica del miembro similar a la contralateral. No existe movilidad a nivel del foco proximal de unión entre el injerto y el hueso del huésped.

#### **5.5.4.2 Estudio histológico**

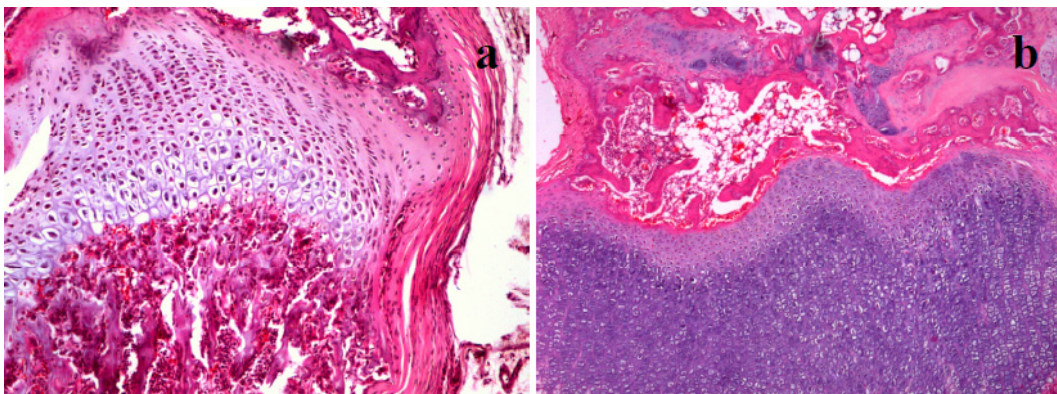
En todos los casos se observa la arquitectura distal del radio trasplantado dentro de la normalidad. En este grupo se han encontrado las placas de crecimiento con un patrón de apariencia viable. En las epífisis de este grupo se han observado unos restos de tejido cartilaginoso, que en un principio



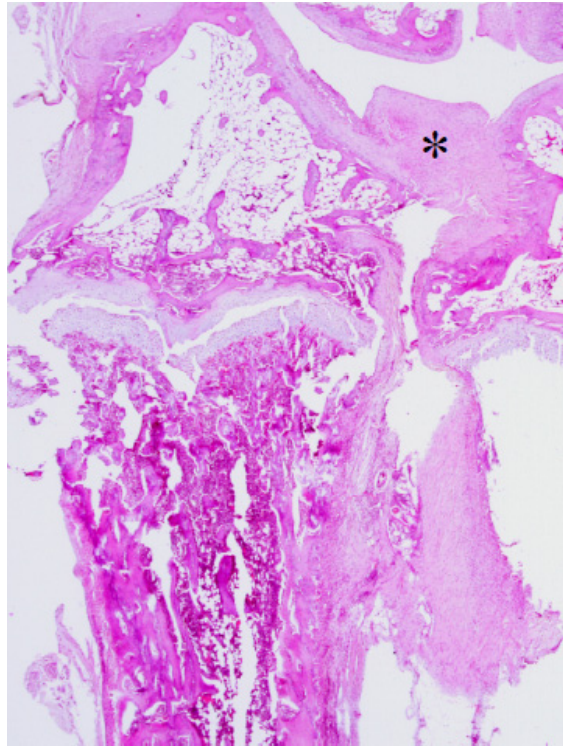
consideramos que eran restos de placa de crecimiento del lecho (Fig.5.71 a y b); sin embargo por debajo de ella se observó una placa de crecimiento con patrones morfológicos de normalidad, correspondientes a la placa trasplantada (Fig.5.72 a y b). La placa de crecimiento del radio se encuentra al mismo nivel que la placa de crecimiento del cúbito. Sin embargo, si se han observado fibrosis del ligamento radio cubital con modificaciones en la epífisis del radio (Fig. 5.73).



**Figura 5.71** (Grupo C-A) a) Epífisis con restos de tejido cartilaginoso. (H-E 4x). b) Epífisis con restos de tejido cartilaginoso (H-E 4x).



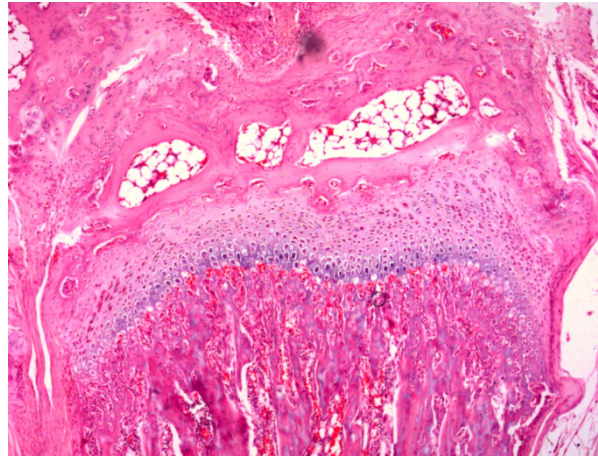
**Figura 5.72** (Grupo C-A) a) Placa de crecimiento con patrones morfológicos dentro de la normalidad (H-E 10x). b) placa de crecimiento con patrón morfológico dentro de la normalidad (H-E 4x).



**Figura 5.73** (Grupo C-A) Se observa las placas de crecimiento del radio y cúbito al mismo nivel. Fractura en la placa de crecimiento del radio. Fibrosis del ligamento radiocubital distal \* (H-E 2x).

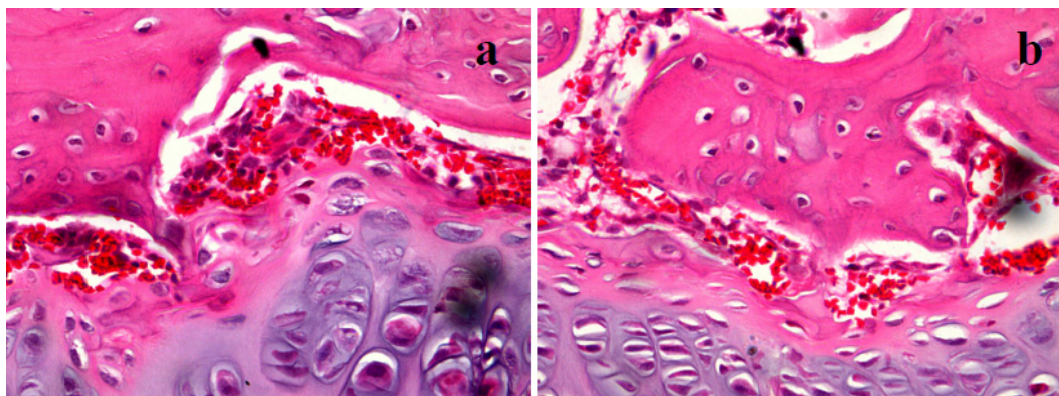
Las epífisis pierden las trabéculas normales, y en algunos casos en su lugar aparecen trabéculas más gruesas de lo normal. También se pierde el tejido hematopoyético de las epífisis y es sustituido por tejido graso, con abundantes adipocitos. En algunas epífisis se han observado también infiltrados de células mononucleadas, compatible con linfocitos. En estos ensayos el infiltrado de células mononucleadas sólo se encuentra en el radio, tanto en la epífisis como en la metáfisis y diáfisis. En el cúbito no encuentran tales lesiones, la placa de crecimiento del cúbito es normal, no muestra alteraciones de ser sometidas a mecanismos de tracción (Fig. 5.74).



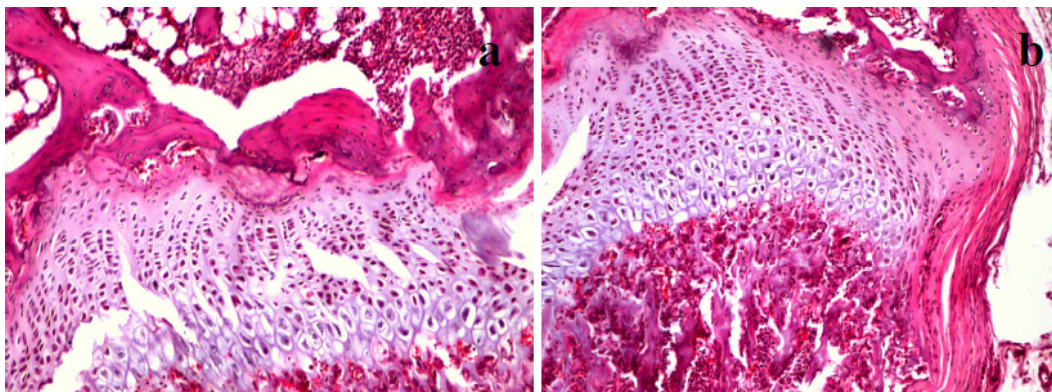


**Figura 5.74** (Grupo C-A) Placa de crecimiento del cúbito de características normales (H-E 4x).

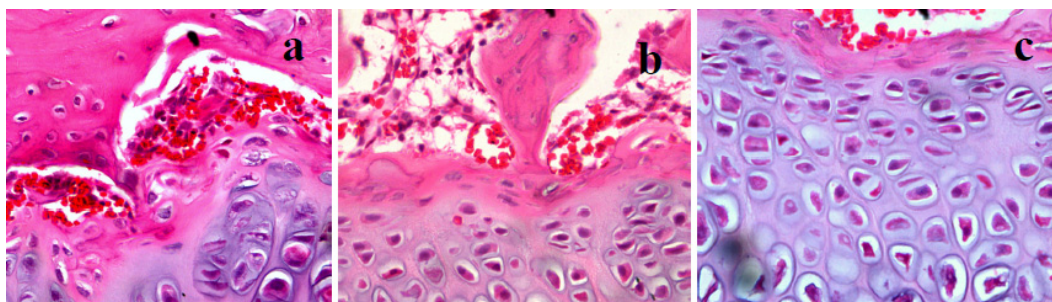
Zona germinativa. En el borde epifisario de las placas, sobre la zona germinativa se observa un patrón vascular compatible con el patrón vascular normal de esta zona (Fig. 5.75 a y b). En este grupo se aprecian células en la zona germinativa, con una morfología similar a los controles, ligeramente menor en número de células por campo de x40 (Fig. 5.76 a y b). Estas células se encuentran inmersas en una matriz extracelular eosinófila (Fig. 5.77a), en la que ocasiones la laguna adquiere una morfología elíptica (Fig.5.77 b y c).



**Figura 5.75** (Grupo C-A) a) Patrón vascular epifisario similar al normal (H-E 40x). b) Patrón vascular epifisario (H-E 40x).

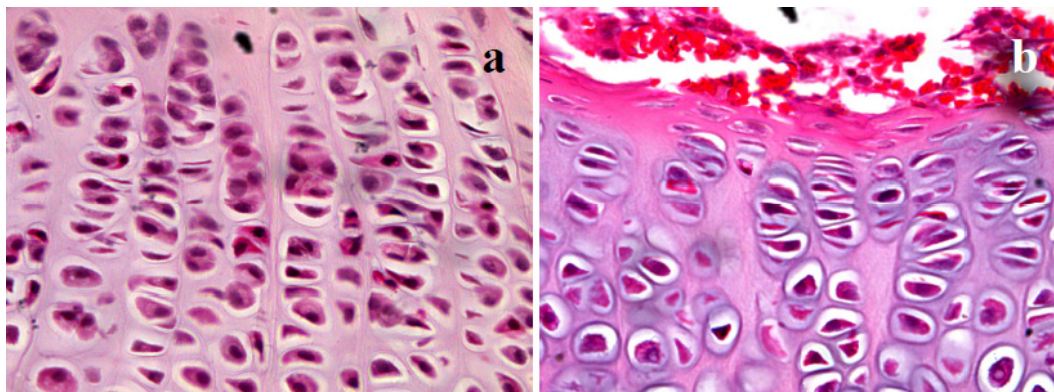


**Figura 5.76** (Grupo C-A) a) Células de la zona germinativa de la placa de crecimiento (H-E 10x). b) Células de la zona germinativa de la placa de crecimiento con patrones morfológicos de normalidad (H-E 10x).



**Figura 5.77** (Grupo C-A) a) Células de la zona germinativa de la placa de crecimiento con presencia de vasos en el hueso supraplaca (H-E 40x). b) Células de la zona germinativa de la placa de crecimiento con presencia de vasos en el hueso supraplaca (H-E 40x). c) Células de la zona germinativa y proliferativa de la placa de crecimiento (H-E 40x).

Zona de proliferación. En la zona proliferativa se observan columnas de condrocitos con una distribución y número de células por columnas, aparentemente semejantes al control (Fig.5.78a). En algunos cortes seriados se han observado irregularidad en la columnas (Fig. 5.78b), e imágenes compatibles con células muertas, por la eosinofilia nuclear.

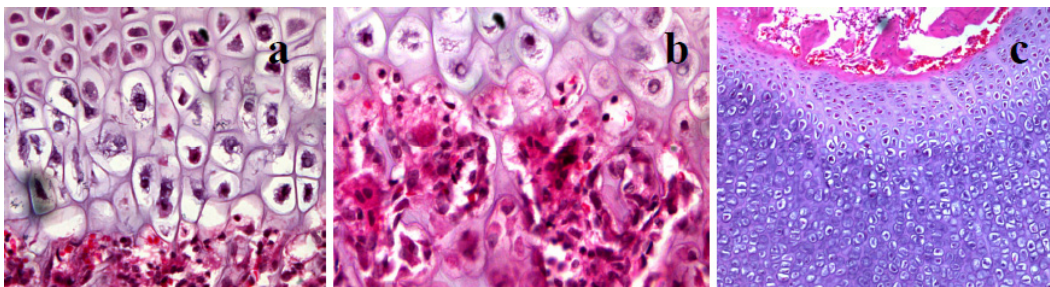


**Figura 5.78** (Grupo C-A) a) La zona del proliferativo presenta una distribución celular similar al grupo control (H-E 40x). b) Irregularidad columnar en la zona proliferativa (H-E 40x).

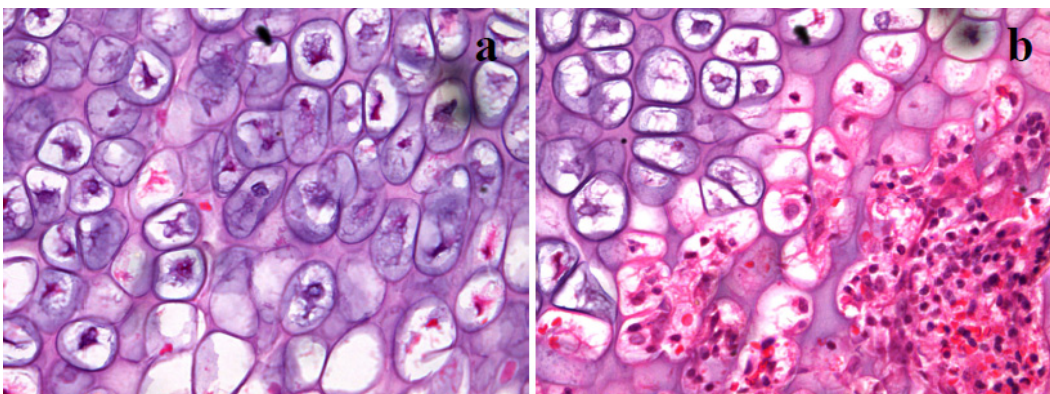
Zona hipertrófica. En la zona hipertrófica se observan columnas con una distribución y número de células por columnas, aparentemente, semejantes al control (Fig. 5.79a). En las últimas células de esta zona, próximas a la metáfisis, se observan lagunas celulares vacías observación similar a las de los controles. También se observan la llegada de vasos a las lagunas abiertas. En estos ensayos, junto a los vasos se observa un patrón de infiltración celular con células polimorfonucleares, así como con células mononucleares. También se observan abundantes células multinucleadas, próximas a la columna de cartílago (Fig. 5.79b); así como, también se observa la carencia de osteoblastos en estas columnas.

En un caso se ha observado un aumento de la zona hipertrófica (Fig. 5.79c). Las zonas germinativa y proliferativa tienen una morfología aparentemente normal; sin embargo, hay un aumento de la zona hipertrófica. En la zona hipertrófica predominan células redondas, con núcleos basófilos; en las zonas de la metáfisis adyacente a estas células se observan una zona de discontinuidad con el hueso diafisario, es decir, no se observan formación de trabéculas. En otras zonas del hipertrófico predominan células hipertróficas aparentemente normal, con formación de trabéculas óseas; en este caso (Fig. 5.80a); en las lagunas condrales vacías y alrededor de las columnas condrales se observan células mononucleadas, granulocitos y algunas células plasmáticas (Fig. 5.80b).





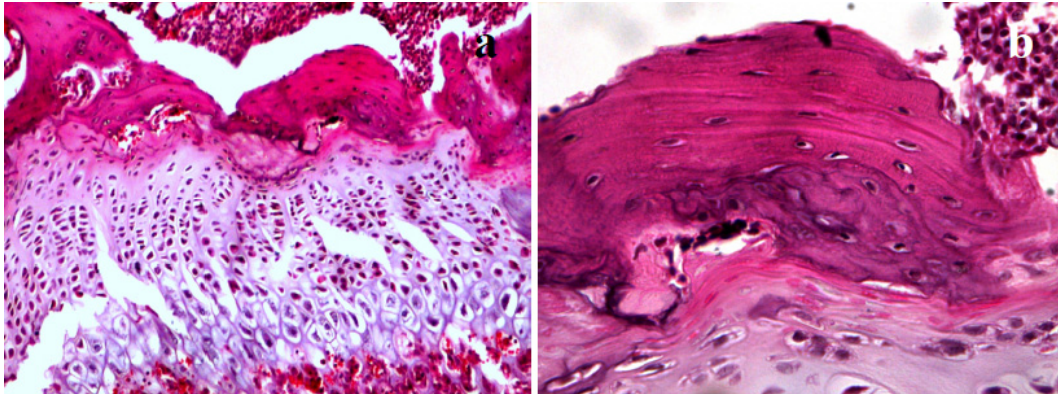
**Figura 5.79** (Grupo C-A) a) Zona hipertrófica con una distribución y número de células por columnas semejantes al control (H-E 40x). b) Presencia de células multinucleadas, osteoclastos, en la zona condrometáfisaria próximos a la placa de crecimiento (H-E 40x). c) En uno de los especímenes estudiados se observa un aumento de la zona hipertrófica de la placa de crecimiento (H-E 10x),



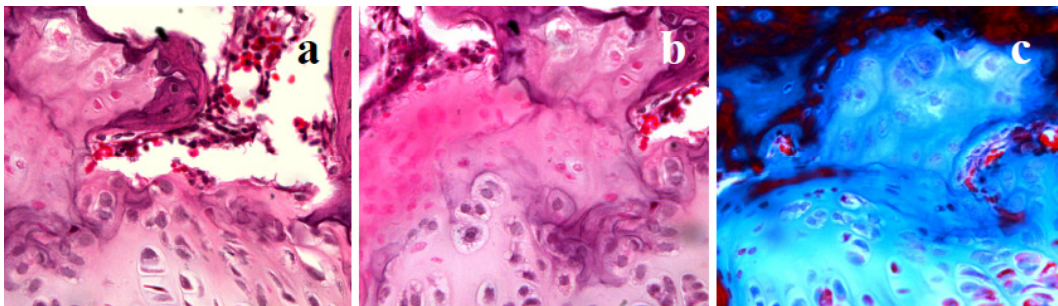
**Figura 5.80** (Grupo C-A) a) En la zona del hipertrófico bajo se observan lagunas condrales vacías (H-E 40x). b) Se observan células mononucleadas, granulocitos y algunas células plasmáticas alrededor de las columnas condrales de la zona metafisaria (H-E 40x).

Hueso supra-placa. En estos casos se ha observado la generación de un nuevo hueso supra-placa sobre la placa de crecimiento trasplantada (Fig. 5.81a). Este hueso es discontinuo, con predominio del hueso lamelar, y aparición de muy poco hueso inmaduro; además, se observan restos de tejidos necrosados entre el hueso supra-placa y la placa de crecimiento, así como una banda de tejido con células con núcleos eosinófilos en la zona alta del germinativo (Fig. 5.81b). En otras preparaciones, en los cortes seriados, se han observado células con un fenotipo típico de la zona germinativa; esto es, células con núcleos redondos basófilos en lagunas redondeadas, que en ocasiones forman pequeñas columnas dirigidas hacia la parte alta del germinativo (Fig. 5.82 a y b). En esta última zona se observa un tejido con una matriz basófila, hipocromática, o eosinófila, en el que se observan unas células, con un fenotipo que se asemeja al de las células del germinativo, con núcleos eosinófilos. En algunos

cortes, sobre estas zonas se depositan hueso inmaduro. Estas células se encuentran englobadas en una matriz de tejido conjuntivo (Fig. 5.82a). Alrededor de esta matriz de tejido eosinófilo o basófilo débil se forma un tejido conectivo óseo (Fig. 5.82c).



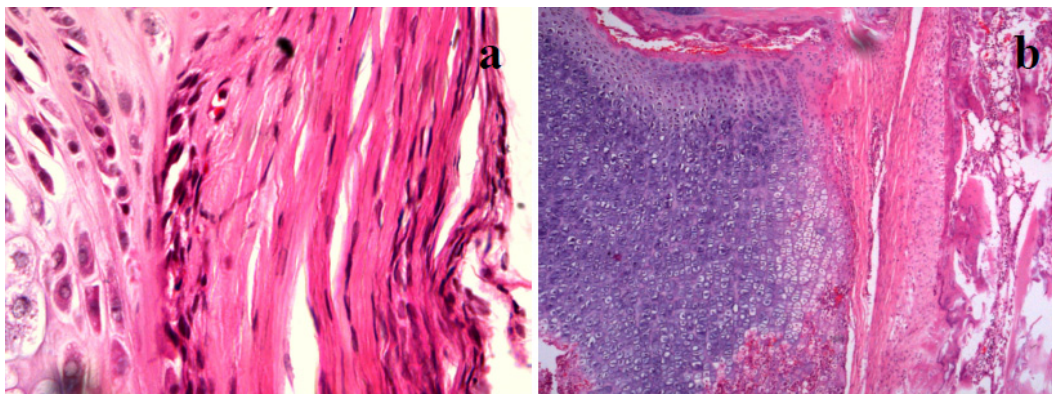
**Figura 5.81** (Grupo C-A) a) Generación de nuevo hueso supra-placa (H-E 10x). b) Se observa restos de tejidos necrosados entre la zona del hueso supra-placa y la placa de crecimiento (H-E 40x).



**Figura 5.82** (Grupo C-A) a) Células con fenotipo típico de la zona germinativa (H-E 40x). b) Células con fenotipo típico de la zona germinativa (H-E 40x). c) Células del hueso supra-placa englobadas en una matriz de tejido conjuntivo (Tricrómico de Masson 40x).

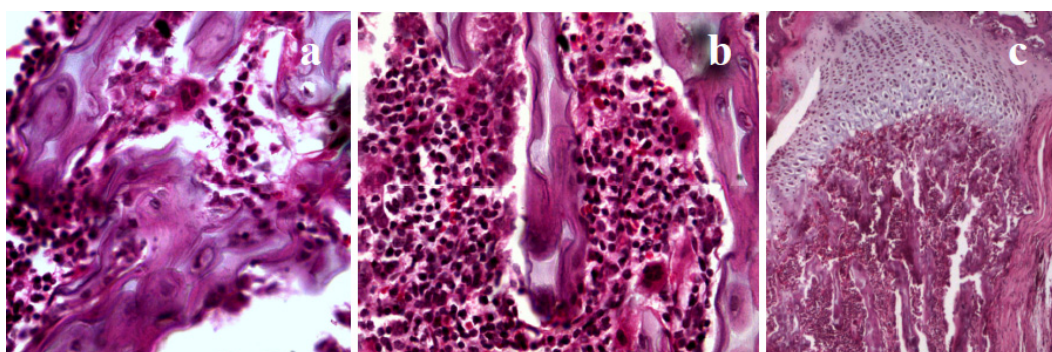
Anillo pericondral. En algunos casos se ha observado un anillo aparentemente normal, tanto en la zona del surco de Ranvier como en la zona del anillo de Lacroix; en esta última zona se han observado células compatibles con osteoblastos sobre la barra ósea (Fig. 5.83a). En otros casos, de forma particular cuando se ha observado hipertrofia de la placa de crecimiento, se observa el anillo fibroso, con un patrón de infiltrado de células mononucleadas, y no se observa barra ósea (Fig. 5.83 b).



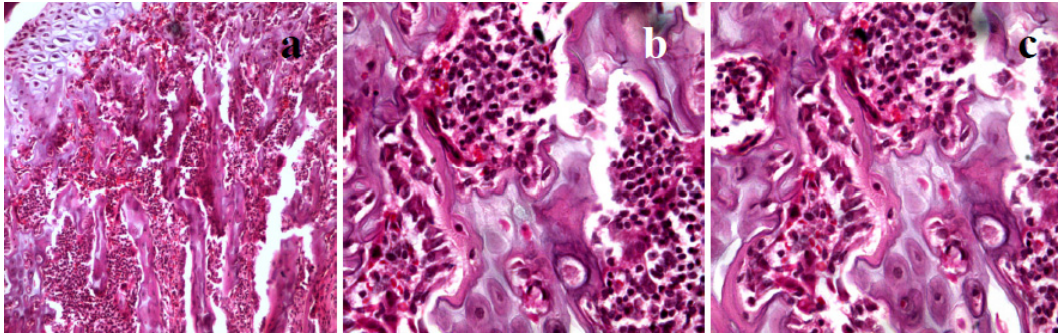


**Figura 5.83** (Grupo C-A) a) anillo de Lacroix; donde se observan células compatibles con osteoblastos sobre la barra ósea (H-E 40x). b) Se observa ausencia de barra ósea con anillo fibroso infiltrado por células mononucleadas (H-E 4x).

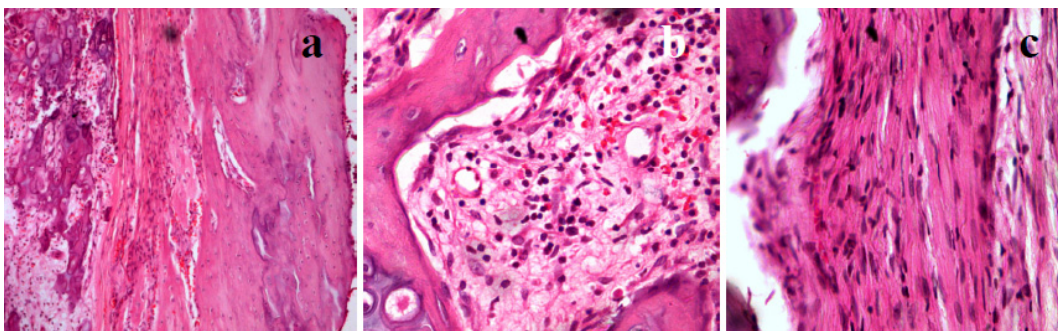
Metáfisis. Presencia de trabéculas irregulares con predominio de tejido condral con abundantes osteoclastos (Fig. 5.84 a, b y c). Ausencia de tejido hematopoyético y presencia de infiltración con un patrón de células de carácter inflamatorio y abundantes células gigantes multinucleadas (Fig. 5.85a). En las trabéculas se observan ribetes osteoblásticos junto con osteoclastos (Fig 5.85 b y c). En algunos cortes se observa la presencia de un tejido fibrograso laxo, con células de carácter inflamatorio, y presencia de restos de cartílago hipertrófico (Fig. 5.86 a y b). No se forma cortical metafisaria de carácter óseo, esta está formada por tejido fibroconjuntivo (Fig. 5.86c).



**Figura 5.84** (Grupo C-A) a) Metáfisis con trabéculas irregulares (H-E 40x). b) Metáfisis con trabéculas con abundante tejido condral (H-E 40x). c) Trabéculas metafisarias con abundantes osteoclastos (H-E 4x),



**Figura 5.85** a) Presencia de infiltración con abundantes células gigantes multinucleadas y ausencia de tejido hematopoyético en la zona metafisaria (H-E 10x). b) Trabéculas con ribetes osteoblásticos junto con osteoclastos en la médula de la metáfisis (H-E 40x). c) Trabéculas con ribetes osteoblásticos junto con osteoclastos en la médula de la metáfisis (H-E 40x).



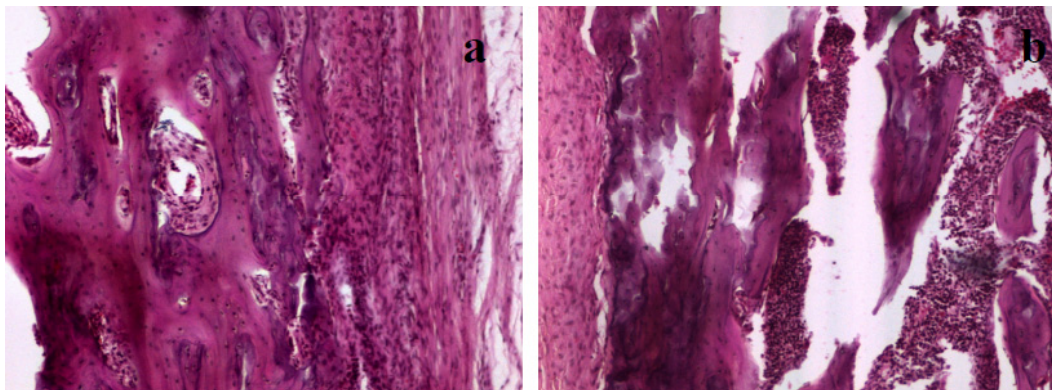
**Figura 5.86** (Grupo C-A) a) Tejido fibrograso laxo con células de carácter inflamatorio en la cortical diafisaria (H-E 10x). b) Tejido fibrograso laxo con presencia de restos de cartílago hipertrófico en la zona metafisaria (H-E 40x). c) Cortical metafisaria formada por tejido fibroconjuntivo (H-E 40x).

Diáfisis del injerto. No aparece tejido hematopoyético. En unos caso se observan trabéculas óseas entre un tejido de células con patrón infiltrativo (Fig. 5.88a), en otros casos se encuentran inmersas en un tejido fibroso con abundantes adipocitos (Fig. 5.88b).

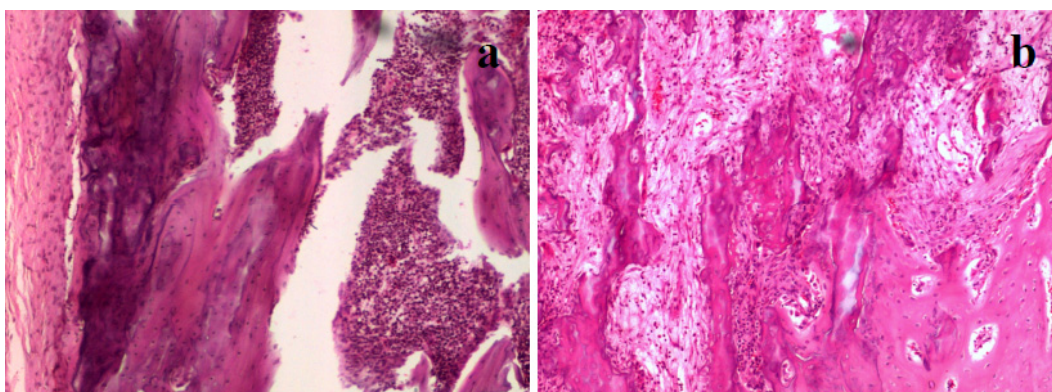
Las corticales del injerto pierden la arquitectura normal, disminuye el hueso lamelar y aumenta la presencia de hueso inmaduro, con aparición de amplias cavitaciones en las que se observan células de patrón infiltrativo (Fig. 5.87a). Las corticales del injerto aparecen, en ocasiones en distintas capas en una misma zona, con zonas de hueso lamelar e inmaduro, en ocasiones ligeramente unido; en algunas preparaciones se observan puentes con la cortical del lecho (Fig. 5.87b). En las corticales del injerto se observa que el hueso inmaduro se encuentra intercalado en menor proporción con el hueso lamelar (Fig. 5.87b).



En el lecho las trabéculas óseas son muy densas, inmersas en un tejido fibroso, con células de carácter inflamatorio. En la cortical del lecho aparecen con un patrón IV descrito previamente.



**Figura 5.87** (Grupo C-A) a) Diáfisis del hueso del injerto. Cortical con disminución del hueso lamelar y aumento de la presencia de hueso inmaduro (H-E 10x). b) Corticales del injerto con hueso inmaduro intercalado, en menor proporción, entre placas de hueso lamelar (H-E 10x).



**Figura 5.88** (Grupo C-A) a) Diáfisis en la que se observan trabéculas óseas entre un tejido de células con patrón infiltrativo. Arriba se observa cortical metafisaria. Abajo se observa cortical del injerto (H-E 10x). b) Trabéculas óseas junto con un tejido fibroso con abundantes adipocitos (H-E 10x).

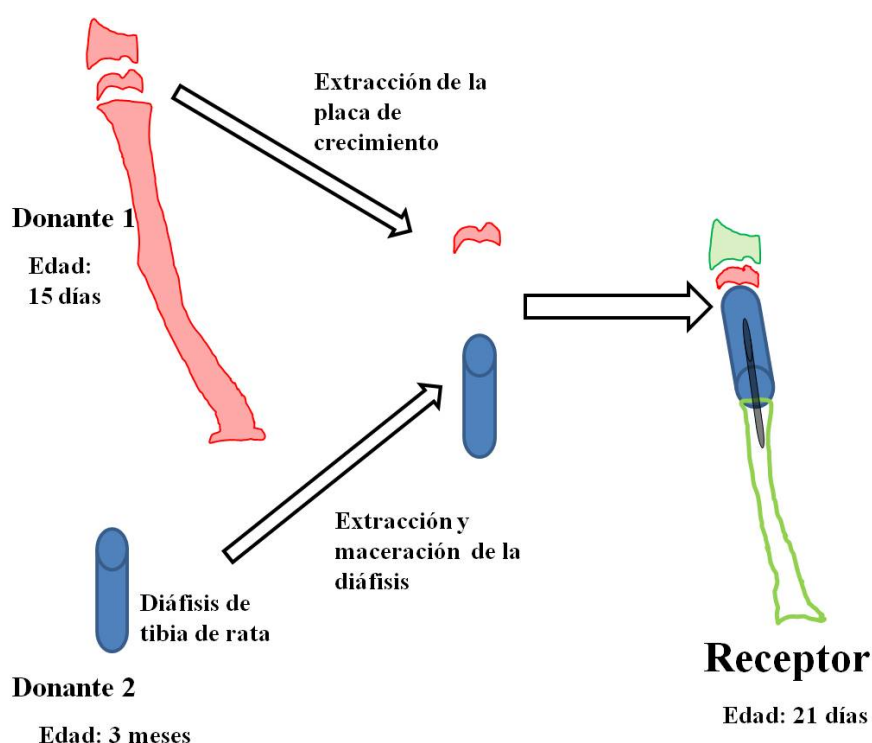
#### 5.5.4.3 Resumen del grupo trasplante de placa de crecimiento y diáfisis (parcial) de distintos donantes (Grupo C-A)

En todos los casos se observa la arquitectura distal del radio trasplantado dentro de la normalidad y al mismo nivel que la placa de crecimiento del cúbito. Las epífisis pierden las trabéculas normales, y en algunos casos en su lugar aparecen trabéculas más gruesas de lo normal. Sobre la zona germinativa se observa un patrón vascular compatible con el patrón vascular normal. Las

células en la zona germinativa tienen una morfología similar a los controles. En las zona proliferativa e hipertrófica se observan columnas con una distribución y número de células por columnas, aparentemente semejantes al control. Se observa la generación de un nuevo hueso supra-placa sobre la placa de crecimiento trasplantada. Se observa una disminución de la altura total de la placa a expensas de la disminución de la altura de la zona del proliferativo. Sin embargo, la anchura de la placa de crecimiento trasplantada es mayor.

La metáfisis presenta trabéculas irregulares con predominio de tejido condral con abundantes osteoclastos. Las corticales del injerto pierden la arquitectura normal, disminuye el hueso lamelar y aumenta la presencia de hueso inmaduro.

#### 5.5.5 Trasplante de placa de crecimiento y diáfisis de tibia (Grupo C-B) (Esquema 10)



**Esquema 10.** Esquema de la intervención trasplante de placa de crecimiento con distintos donantes de placa y hueso donde se ha utilizado un aloinjerto de tibia de rata.

#### 5.5.5.1 Estudio clínico y radiológico

En este grupo tras la eutanasia del animal se extrajo la extremidad, y previo a tallar el radio se identificó el componente osteocondral formado por la epífisis distal del radio, la placa de crecimiento y la diáfisis formada y se separó del hueso de tibia trasplantado; éste último quedaba como un secuestro de color blanco rodeado de tejido fibroso y no aportaba nada al ensayo, más aún, podía complicar el proceso de decalcificación y tallado del espécimen, pues habría requerido más tiempo en ácido lo que implicaría un daño a la pieza de interés (Figs 5.90 y 5.91).

En los casos donde se ha utilizado aloinjerto tibial se observa protrusión del injerto sobre el plano muscular y movilidad del foco proximal de unión del injerto con el hueso huésped.



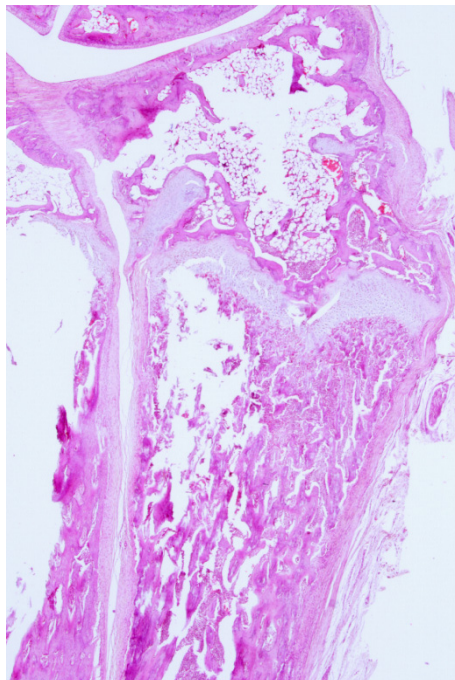
**Figura 5.89** Caso con injerto diáfisario procedente de aloinjerto de tibia fresco perteneciente al grupo C-B.



**Figura 5.90** Caso de aloinjerto diafisario de tibia crioconservada perteneciente al grupo C-B.

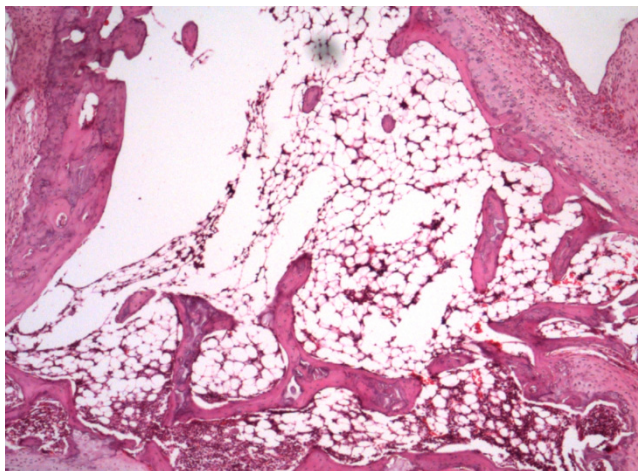
#### 5.5.5.2 Estudio histológico

La placa de crecimiento del radio se encuentra al mismo nivel que la placa de crecimiento del cúbito, a diferencia del grupo anterior, sin cambios morfológicos en el ligamento radiocubital (Fig 5.91). La observación más notable en este ensayo es la presencia de la región metafiso-diafisaria, que no fue trasplantada.



**Figura 5.91** (Grupo C-B) Placa de crecimiento de radio perteneciente al grupo C-B con trasplante de diáfisis tibial donde se observa placa de radio al mismo nivel que la placa del cúbito y sin cambios en el ligamento radiocubital distal. El segmento diafiso-metafisario es el producido a partir de la placa de crecimiento injertada (H-E 2x).

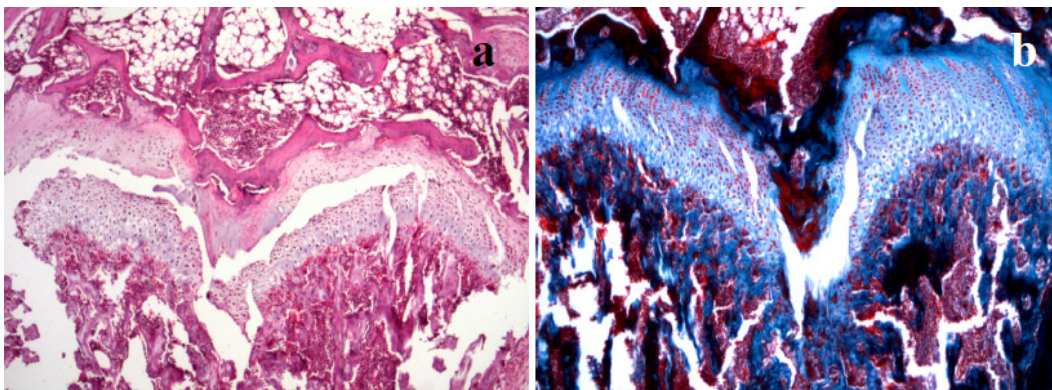
Las epífisis aparecían deformes, tanto en el análisis macroscópico como histológico. En la epífisis se observaba disminución de trabéculas óseas y tejido hematopoyético; así como, la presencia de un tejido adiposo con presencia de un infiltrado de células de carácter inflamatorio. Alrededor de la epífisis se observaba abundante tejido fibroso (Fig. 5.92).



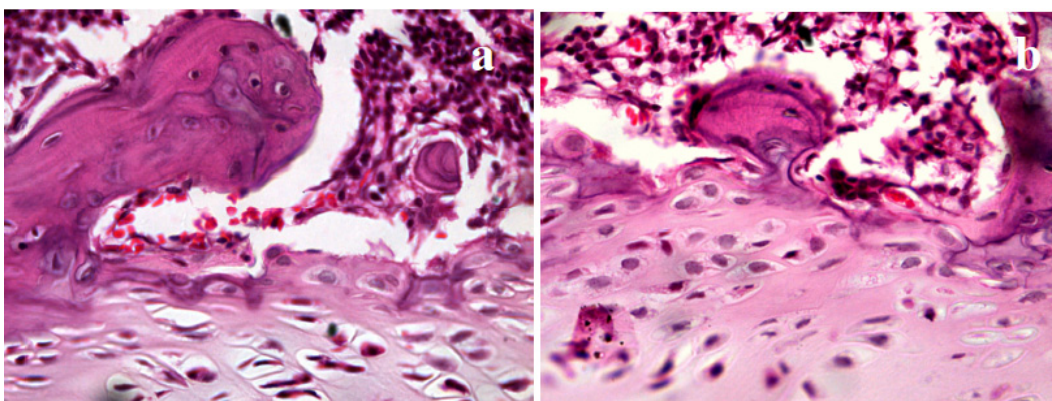
**Figura 5.92** (Grupo C-B) Epífisis deforme con disminución de trabéculas y con tejido adiposo e infiltrado celular inflamatorio (H-E 4x).

Las placas de crecimiento han aparecido fracturadas, no por artefactos, con áreas de necrosis central y basófila en los márgenes de la fractura de la placa (Fig.5.93 a y b). En la zona del germinativo se observaron células con fenotipo normal (Fig. 5.94 a y b). En la zona del proliferativo se observaron células con un fenotipo aparentemente normal, con presencia de algunas células con necrosis (Fig. 5.95). En la zona hipertrófica se observaron células aparentemente normales, con presencia de vasos en la unión condroósea, así como con presencia de células gigantes multinucleadas, polimorfonucleares y células mononucleadas.

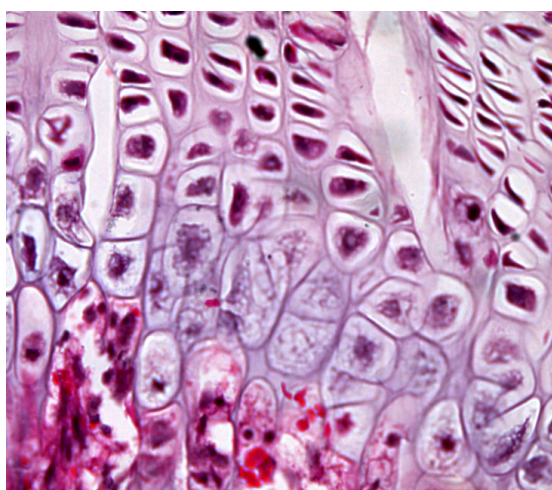




**Figura 5.93** (Grupo C-B) a) Placa de crecimiento fracturada (H-E 4x). b) Placa de crecimiento fracturada (Tricrómico de Masson 4x). En ambas se observa hueso supra-placa y trabéculas metafisarias.

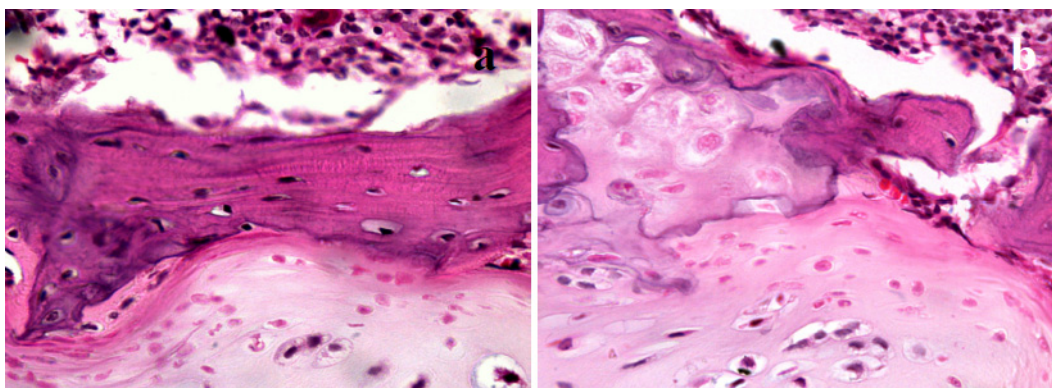


**Figura 5.94** (Grupo C-B) a) Zona germinativa, células con fenotipo similares al control (H-E 40x). b) Zona germinativa, con células con fenotipo similares al control (H-E 40x). En ambas se observa la formación de hueso inmaduro por debajo del hueso lamelar.



**Figura 5.95** (Grupo C-B) Zonas del proliferativo e hipertrófico, células con fenotipo al control y presencia de algunas células necróticas (H-E 40x).

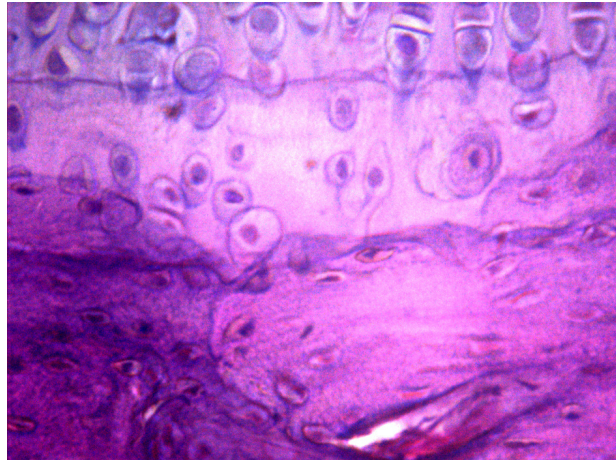
Hueso supra-placa. Hay un predominio del hueso lamelar sobre el hueso inmaduro. El comportamiento de la zona alta del germinativo es muy similar al grupo anterior: presencia de una banda de tejido eosinófilo, con células con núcleos eosinófilos (Fig.5.96a), presencia de células con fenotipo condral, inmersa en un tejido eosinófilo, alrededor de las cuales aparece una banda de tejido óseo inmaduro (Fig. 5.96b).



**Figura 5.96** (Grupo C-B) a) Hueso supra-placa con predominio del hueso lamelar sobre el hueso inmaduro, en la zona alta del germinativo se observa una banda de tejido eosinófilo (H-E 40x).b) Hueso supra-placa. Se observan células con fenotipo condral rodeadas por una banda de tejido óseo inmaduro (H-E 40x).

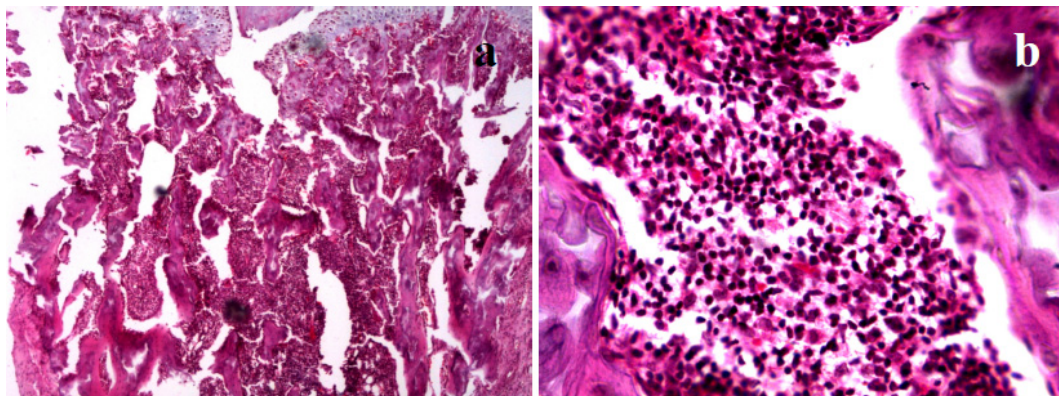
Hemos comparado el sistema de osificación endocondral que hemos descrito en el hueso supra-placa con la imagen de la placa ósea subcondral del cartílago articular. En el hueso supra-placa hemos descrito la formación de hueso inmaduro sobre un molde cartilaginoso. En este molde se han identificado una matriz de tejido conjuntivo, colágeno, Masson positivo y unas células, cuyos núcleos muestran una pérdida de basofilia compatible con un proceso de muerte celular por cariólisis (Fig. 5.97), a diferencia de la muerte celular por apoptosis descrita en la zona hipertrófica. Sin embargo, en la placa ósea subcondral del cartílago articular, se observa que la zona radial baja del cartílago articular se separa por una línea limitante (*tide mark*) de la zona calcificada. A su vez, la zona calcificada se delimita claramente del hueso de la epífisis.



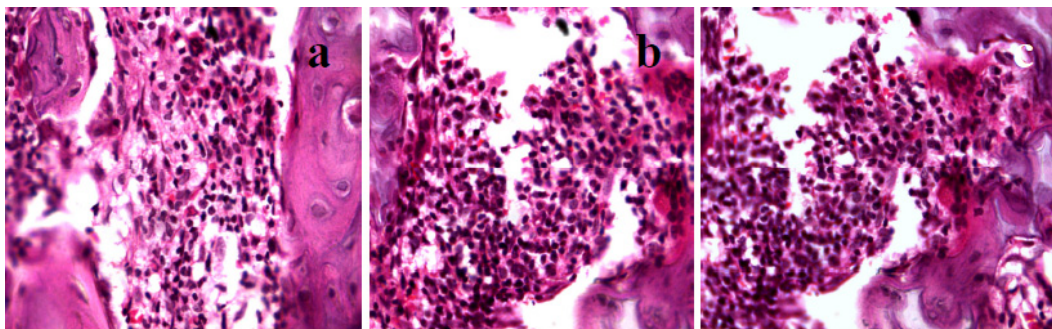


**Figura 5.97** (Grupo control) Corte histológico correspondiente al cartílago articular de un control. En la parte superior se observa la zona radial baja del cartílago, le sigue una línea limitante (tide mark), a esta le sigue la zona de calcificación, y en la parte inferior de la imagen el hueso epifisario (H-E40x).

Metáfisis. Las trabéculas condrales iniciales son muy irregulares, con presencia de vasos y células de carácter inflamatorio (Fig. 5.98a). Las trabéculas son irregulares, no coalescentes, dispersas en un tejido con predominio de células de tipo inflamatorio, y ausencia de tejido hematopoyético (Fig. 5.98 a y b) Abundan macrófagos y polimorfonucleares (Fig. 5.99 a, b y c).

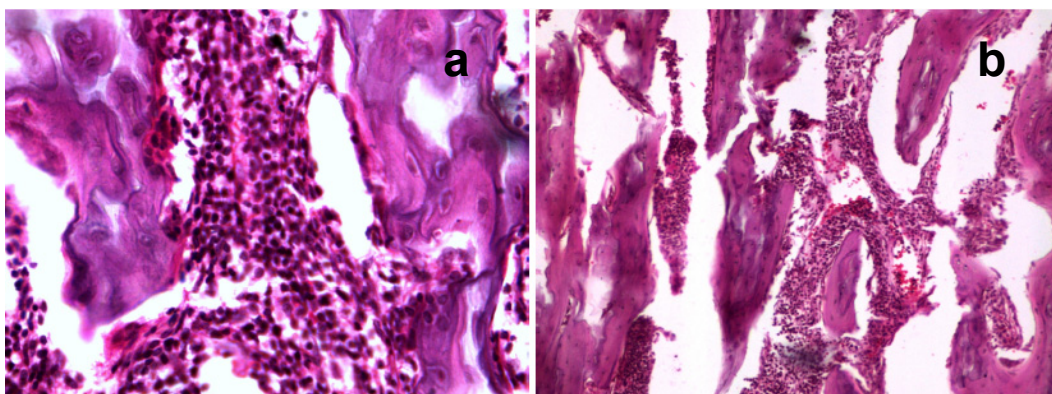


**Figura 5.98** (Grupo C-B) a) Metáfisis, trabéculas condrales irregulares, se observan vasos y células de carácter inflamatorio (H-E 4x). b) En la médula se observan ausencia de tejido hematopoyético y presencia de células mononucleadas (H-E 40x).



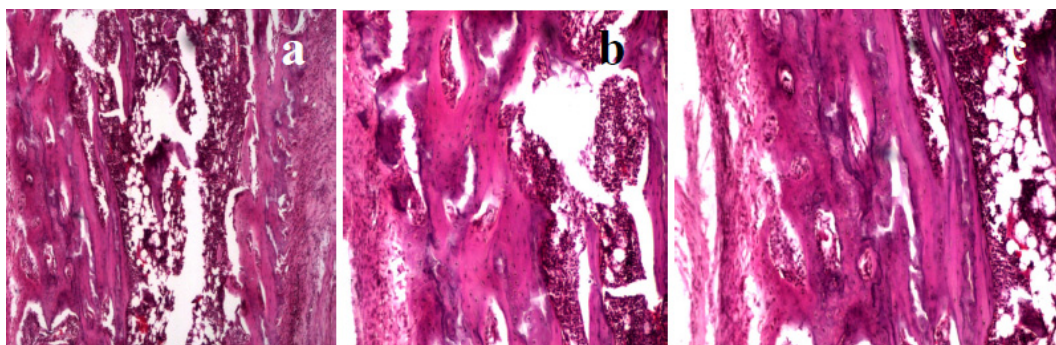
**Figura 5.99** (Grupo C-B) a, b, c) Zona metafiso-diafisaria producida por el injerto, predominio de tejido conjuntivo con presencia de células mononucleadas y multinucleadas (osteoclastos) (H-E 40x).

Cortical. Las trabéculas diafisarias son muy irregulares con abundantes osteoclastos (Fig.5. 100a); predominan la formación de hueso laminar entre las que se intercala hueso inmaduro (Fig. 5.100b). En la cortical se observan escasas células endostales. En médula ósea, no se observa tejido hematopoyético, este es sustituido por un tejido con abundantes células de un patrón inflamatorio. Las trabéculas óseas son escasas y recuerdan a un patrón óseo de hueso cortical. En las zonas más alejadas de la metáfisis se observa el hueso cortical con un predominio de hueso lamelar, en el que se intercala hueso inmaduro (Fig. 5.101 a, b y c). En las corticales no se observa periostio; éste es sustituido por un tejido fibroso que rodea al hueso.



**Figura 5.100** (Grupo C-B) Zona metafiso-diafisaria. Diáfisis, producida por el injerto. a) Trabéculas diafisarias irregulares. En la médula se observa la presencia de osteoclastos (H-E 40x). b) Metáfisis. En la metáfisis se observa un predominio de hueso laminar sobre el inmaduro (H-E 4x).





**Figura 5. 101** (Grupo C-B) Diáfisis producida por el injerto de placa. a) Zona más proximal de la metáfisis donde se observa el hueso cortical con un predominio de hueso lamelar, con hueso inmaduro intercalado (H-E 4x). b) Detalle de a) parte superior izquierda. Cortical del injerto (H-E 10x). c) Detalle de a) parte inferior izquierda. Corticales del injerto (H-E 10x).

### Histometría de la placa

Se ha realizado la medición de la altura de las diferentes zonas de la placa de crecimiento del grupo control y se ha comparado con los resultados de la medición de la altura y anchura de la placa de crecimiento del grupo C-A y C-B (tabla XV).

En el grupo trasplantado se observa una disminución de la altura total de la placa a expensas de la disminución de la altura de la zona del proliferativo. Sin embargo, la anchura de la placa de crecimiento trasplantada es mayor que la anchura de la placa de crecimiento del grupo Control.

**Tabla XXV.** Histometría placa de crecimiento. Comparación del grupo C y Control.

	<b>Grupo control</b> <b>n=9</b> (media ± DE)	<b>Grupo C</b> <b>n=4</b> (media ± DE)	<b>p</b>
<b>Altura del germinativo(micras)</b>	25,27 ± 5,55	17,18 ± 7,54	0,05
<b>Altura del proliferativo (micras)</b>	114,29 ± 15,17	58,36 ± 11,74	0,00*
<b>Altura del hipertrófico (micras)</b>	114,59 ± 40,46	129,42 ± 89,75	0,68
<b>Altura total de la placa (micras)</b>	261,94 ± 29,69	158,64 ± 18,4	0,00*
<b>Anchura total de la placa (micras)</b>	1601 ± 238,16	2505 ± 178,1	0,00*

Test de la t de student. \* Significación estadística para  $p < 0,05$

#### **5.5.5.3 Resumen del grupo trasplante de placa de crecimiento y diáfisis de tibia (Grupo C-B)**

En este grupo la placa de crecimiento del radio se encuentra al mismo nivel que la placa de crecimiento del cúbito. La observación más notable en este ensayo es la presencia de la región metafiso-diafisaria, que no fue trasplantada. Las epífisis aparecen deformes. Las placas de crecimiento aparecen fracturadas, no por artefactos. Las células del germinativo proliferativo e hipertrófico presentaban un fenotipo normal. En el hueso supra-placa existe un predominio del hueso lamelar sobre el hueso inmaduro. Las trabéculas condrales de la metáfisis y la diáfisis son muy irregulares.

## **6 DISCUSIÓN**

### **Generalidades**

En la actualidad el trasplante de placa de crecimiento en el humano no es posible. Los modelos experimentales descritos han fracasado. Partiendo del principio reconocido de que el cartílago puede sobrevivir en un medio con hipoxia, durante un corto periodo de tiempo, se han planteado dos preguntas: Primera, ¿Qué capacidad de sobrevivencia tiene el alotrasplante de placa de crecimiento en fresco, avascular, ortotópico, encastrado en su lecho, tratado o no con células mesenquimales estromales? Segunda, ¿En un medio líquido fisiológico, serohemático, qué capacidad de sobrevivencia tiene el alotrasplante de placa de crecimiento en fresco, avascular, ortotópico, combinado con un alotrasplante de hueso?

Con estas hipótesis, se han planteado dos objetivos: el primer objetivo, tras las discrepancias encontradas en los trabajos previos en nuestro laboratorio, es analizar la viabilidad del trasplante homólogo de placa de crecimiento simple, ortotópico, sin aporte vascular, tanto en fresco como conservado, tratado y no tratado con células MSC. El segundo objetivo se ha planteado a partir de la observación clínica en la que, en ocasiones, la presencia de un tumor maligno próximo a la placa de crecimiento requiere la resección de un segmento en el que se incluye hueso y placa de crecimiento; el segmento resecado puede incluir parte de la epífisis, placa de crecimiento y una región metafiso-diafisaria, o bien la zona fiso-metafiso-diafisaria. A partir de éste último presupuesto, el objetivo que se propone es analizar la viabilidad de unos modelos experimentales, en los cuales se analizan distintos tipos de injertos combinados condro-óseos, formados por placas de crecimiento y hueso, que de alguna forma se puedan equiparar al segmento resecado en la clínica.

### **Crítica del método**

Previo a la discusión de los resultados, en este trabajo es muy importante la crítica de los problemas encontrados en los métodos. En el análisis de los problemas de métodos se incluyen las observaciones realizadas en los ensayos y en los pre-ensayos.

Los fallos del trasplante único de placa de crecimiento fueron descritos por Ring (Ring 1955). Este autor describió que tras una resección en bloque de la placa de crecimiento ocurrió un crecimiento normal del hueso en un animal, de

su grupo de ensayo, lo que podía ser asociado a una resección incompleta de la zona de reserva, o zona germinativa, de la placa; por lo cual, recomendaba dejar una pequeña lámina de hueso unida al trasplante. Sin embargo, la circulación del fluido tisular a las células germinales se podría también ver interferida por esta lámina de hueso, si el grosor de esta lámina fuera grande (Harris *et al*, 1965). Estos autores recomendaban hacer un curetaje de esta lámina de hueso. En este trabajo se ha seguido esta técnica.

Hay un paso importante a tener en cuenta, y, es que tras la osteotomía epifisaria hay que comprobar en todos los casos que la lámina de hueso ha de cubrir toda la placa de crecimiento; de no hacerlo, se puede cometer el fallo de dejar sin células la zona germinativa del trasplante. Este problema sería fácil de resolver si la placa de crecimiento fuera un cilindro exacto; pero hemos observado que la superficie epifisaria de la placa de crecimiento, en nuestro caso del radio, no es plana sino ondulada e irregular y no siempre fácil de observar.

En nuestro ensayo, en todos los casos se han usado como donantes placas de crecimiento de ratas macho jóvenes (15 días), la sección por el borde epifisario de la placa se ha realizado, mediante técnica de transiluminación, a través del centro secundario de osificación, y después se ha realizado el curetaje de hueso residual. Esto garantizaba que la placa a trasplantar conserva integra todas sus zonas, y que en la zona del lecho no quedarán células germinales residuales; aún así, en la zona del lecho se observaron casos que, tras el tiempo de ensayo, mostraban células condrales que no formaban placa de crecimiento en los bordes epifisarios del lecho. Pensamos que estos condrocitos proceden de un anillo de células condrales marginales que se describe en esta zona de la epífisis.

La fijación de los segmentos trasplantados presenta un problema técnico mayor. En los trasplantes de huesos una buena adaptación y la fijación del injerto al lecho es un paso muy importante. En los modelos vigentes de trasplante de placa, en los que la placa se encastra entre la epífisis y la metáfisis el problema no es tan complejo. Sin embargo, en nuestro caso, referente al segundo objetivo, interesaba dejar a la placa inmersa en un baño de fluido, y no se ha encontrado una técnica quirúrgica de fijación que no dañara la placa de crecimiento. En el injerto óseo no ha ocurrido así, y se ha podido dejar estable en el lecho con una osteosíntesis intramedular. Por esta razón la fijación



de toda la extremidad dentro de un tubo de plástico ha ayudado a resolver parcialmente el problema. Nuestros resultados muestran que es una buena solución, pero no creemos que sea la definitiva.

En los ensayos para resolver el segundo objetivo se administró tacrolimus a los animales, como inmunosupresor. El tratamiento con tacrolimus para disminuir el rechazo ha presentado varios problemas. En un primer grupo se administró tacrolimus a la dosis recomendada en la literatura, 0,1mg/kg/día vía intraperitoneal, y los animales presentaron graves complicaciones cutáneas y en mucosas (ojos, boca y ano), y por recomendación de la Dra. Fernández Criado, del Comité de Ética, se suspendió esta vía de administración. En un segundo grupo se administró la misma dosis por vía oral, disuelta en agua de bebida, pero se forma un precipitado del preparado, no controlando la dosis administrada. Finalmente se administró un tercio de la dosis por vía subcutánea, este grupo corresponde a los ensayos que presentamos en este trabajo. Sin embargo, al final del periodo de estudio, observamos que en la zona de administración del preparado de tacrolimus se apreciaba un pequeño granuloma de cuerpo extraño que interpretamos como una respuesta a una precipitación cristalizada de fármaco administrado. Así pues, pensamos que nuestro tratamiento ha sido insuficiente. Creemos que esto hay que tenerlo en consideración cuando se comente, más adelante en la discusión, la histopatología de la médula ósea en nuestro ensayo. Este problema hay que tenerlo en consideración en los próximos ensayos para mejorar el tratamiento de inmunosupresión que lo consideramos muy importante.

Otro problema es que la insuficiencia del fluido tisular puede dañar la placa trasplantada (Harris *et al* 1965). Los resultados de estos autores demuestran que la placa de crecimiento se puede mantener en un cierto periodo de hipoxia hasta la revascularización. El hecho de que un trasplante no sobreviva si hay un retraso de la revascularización sugiere que hay un límite de tiempo para la nutrición de las células del germinativo (Harris *et al* 1965), pero el tiempo de este límite es desconocido.

Se admite que la placa de crecimiento no puede sobrevivir sin un patrón de nutrición, en nuestro caso vascular, en ambos lados de la placa. Sin embargo, en uno de los grupos, en el que se realizó una desconexión de los vasos epifisarios y metafisarios, se han observado restos viables de placa de

crecimiento. Como también se ha observado que la placa de crecimiento puede sobrevivir sin un patrón vascular en la parte alta de la placa, aunque no sean placas completas, como se ha observado en el Grupo G. En el Grupo C, en el que la placa de crecimiento estaba separada por ambos lados de los huesos del lecho, encontramos que en ambos bordes de la placa de crecimiento se observó un patrón de vascularización. Estos aspectos se comentarán más adelante. Pero seguimos sin conocer el periodo de tiempo límite de viabilidad de las células de la placa de crecimiento sin nutrición.

Durante los ensayos, en este trabajo se presentó un problema técnico muy importante, que en un principio no supimos resolver, hasta muy avanzado el ensayo. Este consistió en que durante la sección de los bloques de parafina con el microtomo, a 7 micras, todos los cortes aparecían rotos, lo que nos obligó a realizar cortes gruesos entre 10 y 12 micras. Se revisaron de forma exhaustiva todos los pasos del procedimiento y no se encontró fallo alguno. Todo parecía extraño, sobre todo porque al comprobar la decalcificación sobre la porción próxima de la diáfisis del radio la decalcificación parecía correcta. Ello nos llevó a aumentar el tiempo de decalcificación, tanto con ácido nítrico al 5%, con los riesgos subsiguientes de encontrar necrosis de tejidos lo que nos hizo abandonar estos tiempos prolongados de decalcificación. El problema se identificó al analizar los casos tratados con células MSC, y observar la presencia de hueso compacto, ebúrneo, en todos los casos (aspecto que se comentará más adelante). Al analizar el resto de los casos, de forma retrospectiva, se observó que el hueso cortical epifisario también aumentaba de grosor. El problema consistía en que por no lesionar la zona próxima a la placa de crecimiento y producir un artefacto local, nunca se comprobó la decalcificación en esta zona.

#### **Análisis de los Grupos Controles: Normal y de Resección de placa de crecimiento.**

En el grupo control se analiza la morfología de la placa de crecimiento, morfología que es sobradamente conocida en la literatura. Hay dos aspectos particulares que queremos analizar. El primero hace referencia al hueso supra-placa y el segundo hace referencia al crecimiento de la placa de crecimiento.

El hueso supra-placa es un componente óseo de la epífisis al que normalmente no se hace referencia en la literatura revisada, con la excepción de

lo citado por Harris y cols (Harris *et al* 1965) que lo considera hueso de la epífisis. En nuestro laboratorio, ha sido descrito como “hueso supra-placa”, y estudiado (Delgado-Martos 2010). Está constituido por una lámina de tejido óseo situada sobre la placa de crecimiento adyacente a la misma con una solución de continuidad con respecto a la placa en distintas zonas por las que penetran los vasos epifisarios que van a irrigar la parte alta de la placa. El hueso supra-placa se localiza en la epífisis, situado sobre la placa de crecimiento, y está constituido a su vez por dos componentes óseos, uno de tipo laminar y otro inmaduro, ambos en una proporción (según medición de la altura) aproximadamente de 3 a 1, si bien esta proporción no es constante en todas las preparaciones. También ha descrito que el hueso supra-placa tiene un número de células (por mm<sup>3</sup>) similar a la cortical, con una fracción de volumen menor que la cortical y el volumen (μ<sup>3</sup>) de las células es mayor que el volumen de las células de la cortical. Aunque carece de un patrón vascular como el que se describe en el hueso de la cortical.

Hemos observado puentes ocasionales, de tejido cartilaginoso o de tejido óseo, que unen de una forma íntima el hueso supra-placa y la zona germinativa; así como, la presencia de grupos celulares del germinativo que de alguna forma penetran en el hueso supra-placa en íntima relación con la zona de hueso inmaduro; incluso se han observado numerosas preparaciones en las cuales células compatibles con condrocitos de la zona germinativa aparecen en la zona del hueso inmaduro del hueso supra-placa. Éstas células, en ocasiones, se encuentran rodeadas, de forma aparente, de un tejido óseo, circunstancia ésta que no sabemos explicar por el momento.

En el presente trabajo se ha observado en las zonas donde están ausentes los condrocitos de la zona germinativa, no se forma hueso inmaduro. Esta observación nos hace sugerir que en la placa pueden existir dos frentes de osificación. Esta última observación fue descrita también por Harris y cols. (Harris *et al* 1965); aunque, este autor hace referencia, únicamente, a que células del germinativo pueden participar de forma directa en la formación de hueso en la epífisis. Aspectos más particulares de esta relación de la zona germinativa y hueso supra-placa se discutirá más adelante según los grupos de ensayos.

¿Qué le ocurre al hueso supra-placa si se quita la placa de crecimiento? Si consideramos que el hueso supra-placa es un componente de la epífisis habría que esperar que al retirar la placa de crecimiento el hueso supra-placa persistiera o al menos el componente de hueso laminar. Sin embargo, las observaciones realizadas en el ensayo del grupo D nos muestra que: en todos los casos donde se ha retirado la placa de crecimiento, con la técnica descrita en el método, no se observa hueso supra-placa. La duda que nos queda es si al realizar el corte por el lado más próximo a la placa hemos resecado un tejido responsable de formar el hueso supra-placa. También queda la duda si al retirar la placa de crecimiento se retirara, de algún modo que desconocemos, un factor de inducción de la placa de crecimiento para formar el hueso supra-placa. En el momento actual no encontramos una explicación a esta última posibilidad lo que exigiría estudios específicos para el tema.

En cuanto a la epífisis si se quita la placa de crecimiento, ensayo realizado en el grupo D, citado en el párrafo anterior, ensayo en el que es importante resaltar que siempre se ha procurado respetar los vasos epifisarios, llama la atención la presencia de epífisis de mayor tamaño que el control; y, si en el grupo control las epífisis tienen forma de trapecio vistas en un plano de corte sagital, en este grupo de ensayo las epífisis, en el mismo plano de corte, tienen la misma forma pero muy alargada en sentido longitudinal. A su vez se ha observado ausencia de tejido hematopoyético que es sustituido por tejido adiposo y la ausencia de trabéculas secundarias; así como aumento de grosor de las paredes de los bordes laterales de la epífisis y de algunas de las escasas trabéculas secundarias residuales. Ésta última observación la podríamos explicar por la ley de Wolf.

#### **Análisis de Resultados correspondientes al Primer Objetivo: Trasplante simple de Placa de Crecimiento.**

La placa de crecimiento va al fracaso en todos los ensayos, excepto en dos casos; a pesar de que hemos encontrado patrones de vascularización en ambos bordes de la placa en bastantes casos, así como, un discreto patrón infiltrativo de células mononucleadas. En estos ensayos se han observado restos de placa con elementos celulares viables, considerando como viables en este trabajo a la presencia de basofilia de los núcleos. Las causas íntimas de este fracaso las desconocemos; podemos sugerir que el patrón vascular no sea

suficiente porque en ocasiones se observan trombosis en los vasos con las consabidas repercusiones que tienen en las zonas germinativa e hipertrófica de la placa. En algunos casos se han observado como las células del germinativo adquieren el patrón de una suelta de globos hacia la zona del hueso supra-placa. El hueso supra-placa se encuentra fragmentado y con un predominio de hueso inmaduro. El predominio de hueso inmaduro, en todos los casos, tanto de este ensayo como en los realizados para responder al segundo objetivo, se encuentra asociado a la presencia de células de la zona germinativa. Esta observación sólo la podemos comunicar, pues desconocemos la relación íntima de la zona germinativa con el hueso supra-placa.

Sin embargo, en este grupo de ensayos hay dos observaciones que ha llamado la atención. En un ensayo, en el grupo de trasplante en fresco de seis semanas de evolución, aparece un caso con una placa de crecimiento de gran tamaño, alcanza casi 2 mm de alto, en la que predomina la zona hipertrófica. En este caso se encuentra un antagonismo con la observación descrita en la literatura y en el resto de nuestros trabajos, en los cuales la placa de crecimiento fracasa y no crece. En otro ensayo, aparece una placa de crecimiento expandida con un gran infiltrado de células mononucleadas.

#### **Análisis de la placa de crecimiento expandida.**

¿Por qué, en estos casos, la placa de crecimiento tiene esta imagen expandida? No sabemos explicarlo. Se ha observado que el fenotipo de los condrocitos predominantes es de tipo hipertrófico, ocupan más espacio y expanden la placa de crecimiento. La regulación de la conversión del fenotipo de condrocitos pequeños, en la zona proliferativa, al fenotipo de condrocito grande en la zona del hipertrófico es un hecho importante en los mecanismos de control de la placa de crecimiento (Iannotti *et al* 2000). El eje Ihh-PTHrP proporciona una realimentación negativa en el gobierno de esta conversión (Vorkamp *et al* 1996, Lanske *et al* 1996). Una perturbación de esta vía interrumpe la diferenciación terminal de los condrocitos de la placa de crecimiento, lo que da lugar a varias patologías del esqueleto, tales como Displasia Epifisaria, o la Condrodisplasia Metafisaria de Jansen (Schipani *et al* 2003). Sin embargo, la ruptura de este eje, en el caso de que PTHrP no funcione (y sabemos que PTHrP inhibe la diferenciación de los condrocitos proliferativos a hipertróficos), originaría un aumento de la zona proliferativa; puesto que Ihh es un factor que influye en la

proliferación. Dado que en nuestro caso no se observa aumento de la zona del proliferativo se descarta esta explicación.

En el raquitismo, en histología, las zonas de reserva y proliferativa son normales pero la zona hipertrófica es más extensa, en altura y en anchura; esto último, se observa en la radiología convencional como un ensanchamiento de la placa de crecimiento (Schipani *et al* 2003). En el raquitismo los condrocitos siguen madurando y entran en hipertrofia, pero los condrocitos no pueden reabsorber las células hipertróficas, dado que el cartílago no calcifica, por deficiencia en las vesículas de la matriz tras el déficit de vitamina D. Algo parecido ocurre en la hipofosfatemia, pero en esta última el déficit de vitamina D se debe a la bajada del fosfato (Boyan *et al* 2002, Sabbagh *et al* 2005). La Displasia de Jansen tiene una imagen radiográfica similar al raquitismo con un ensanchamiento de la zona hipertrófica, aunque en este caso se describe una alteración del eje PTHrP/lhh (Schipani *et al* 2003). En nuestro estudio, no encontramos criterios para incluir la lesión descrita como un raquitismo o en la enfermedad de Jansen.

Sin embargo, otros autores preconizan que los casos de expansión de condrocitos en placa de crecimiento puede ser por disminución del proceso de apoptosis de las células de la placa de crecimiento (Donohue *et al* 2002). Otros autores han descritos hipertrofia de condrocitos en dietas deficitarias en calcio (Long 1984); otros, en dietas ricas en manganeso (Svennsson *et al* 1985). Estos aspectos no se han estudiado en este trabajo.

Otra posibilidad para explicar la imagen histológica de este caso es que los condrocitos hipertróficos no expresen el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). La ausencia de VEGF altera la arquitectura de la placa de crecimiento y repercute en el crecimiento longitudinal del hueso, acompañándose de un aumento de la región hipertrófica, así como de ausencia de vasos (Brochhausen 2009). En el primer caso que describimos se acompaña de la ausencia de un patrón vascular en la región condrometáfisaria. No podemos descartar la ausencia de VEGF comocausa. Una última posibilidad podría ser que por la alteración de estas células haya una ausencia de metaloproteinasas de la matriz (MMPs), en particular de la MMP-9 (Wu *et al* 1998). La ausencia de MMP-9 produce un déficit de angiogénesis, reduce la apoptosis de condrocitos, ensancha la zona hipertrófica y disminuye la

mineralización de la matriz. En relación con esta observación, si podemos decir que en los cortes histológicos se han observado: aumento de la zona hipertrófica, ensanchamiento de esta zona y condrocitos hipertróficos con núcleos basófilos, lo que sugiere la reducción del proceso de apoptosis en el caso que describimos.

La segunda observación corresponde a un caso, en el grupo de trasplante en fresco, doce semanas de evolución, en el que se observa una placa de crecimiento igualmente hipertrófica, como en el caso anterior, y la presencia abundante de un patrón de células de carácter inflamatorio que rodea e invade la placa de crecimiento en múltiples focos. Este caso nos ha llamado la atención porque hasta ahora se asumía que la placa de crecimiento si bien originaba una respuesta inmunológica mínima, no se ha encontrado descrito un caso con tanta abundancia de células linfocíticas. En la experiencia de este laboratorio se han realizado más de 500 trasplantes de placa en las distintas tesis realizadas y nunca se había observado un hecho similar. Al igual que en la observación anteriormente descrita por Ring (Ring 1955), donde la presencia de un solo caso en su ensayo justificaba modificar la técnica, la observación de este resultado nos condujo a realizar tratamientos de inmunosupresión en los ensayos propuestos en el segundo objetivo.

En el espacio medular de la diáfisis de estos grupos es habitual la ausencia de tejido hematopoyético, presencia de tejido fibroso y la presencia de células de respuesta inflamatoria. Sin embargo, en dos casos se ha observado el espacio medular ocupado en su totalidad por tejido fibroso formado por fibras de tejido conjuntivo, como fibras deshilachadas; unas con una arquitectura anisotrópica laxa, y, otras con una distribución isotrópica. Inicialmente, en algunas preparaciones, se pensó la posibilidad de que fueran fibras de reticulina, pero el grosor de las fibras, la acumulación en haces (sin dibujar una arquitectura tisular) y la tinción de Masson nos hizo decantar hacia las fibras de colágeno.

#### **Análisis de los casos en los que se han administrado células mesenquimales (MSC).**

En los casos en los que hemos administrado células MSC, tanto en trasplante en fresco como en trasplante crio-conservado, las placas fracasan, así como también fracasan en los ensayos de placas crio-conservadas no tratadas con células MSC. El banco de placas crio-conservadas, a partir de los tres



meses, tanto tratadas con células MSC como no tratadas, no es una solución viable.

Sin embargo, cuando se ha administrado células MSC ha llamado la atención la abundante presencia de un tejido óseo muy compacto, ebúrneo, alrededor de la placa. Esta observación es antagónica a la observación descrita en dos trabajos de tesis realizados en este laboratorio (Escario 2008; Delgado-Martos 2010). En estas tesis se administraron células MSC en dosis equivalentes a las de este trabajo. En el primer trabajo (Escario, 2008) en estudio de trasplante de placa de crecimiento tratadas con las mismas células MSC que en este ensayo, se observaron tres resultados diferentes: en un grupo, se observó la presencia de una placa de crecimiento hipertrófica similar a la descrita anteriormente en el trasplante en fresco; en el segundo grupo, se observó fracaso de la placa de crecimiento; y, en un tercer grupo se observó la presencia de placas de crecimiento aparentemente normales. En el segundo trabajo (Delgado-Martos 2010), en un modelo experimental de osteoporosis inducida, que cursó con pérdida de la actividad funcional de la placa, tras el tratamiento con células MSC se observó la regeneración de la placa de crecimiento.

Vistos en conjunto los resultados obtenidos en el transcurso de estos años en este laboratorio mediante la administración del mismo tipo de células MSC, obtenidas en las mismas condiciones, se ha observado: que en un grupo de animales en el que se buscaba la respuesta condrogénica de la placa de crecimiento trasplantada no se obtuvo ningún resultado positivo, la placa fracasó en todos los casos. En otro grupo de animales, en las mismas condiciones experimentales que el grupo anterior, se obtuvo un excesivo aumento de tamaño de la placa de crecimiento (que llegó a medir hasta 3 mm de altura) por expansión de células hipertróficas en la zona hipertrófica, con fracaso en la formación de trabéculas. En dos casos excepcionales del mismo ensayo se obtuvo una placa de crecimiento normal. En un ensayo de administración de estas células en un modelo experimental de osteoporosis, tras la administración de estas células, el defecto de la placa se corrige aumentando incluso el número de células. Y en el presente ensayo, cuando se pretendía un efecto condrogénico, se ha observado todo lo contrario: encontramos un efecto osteogénico.

¿Cómo se pueden interpretar esta heterogeneidad de resultados?

A partir de los trabajos de Caplan (Caplan 2007) se conoce que estas células tienen un efecto trófico, un efecto angiogénico, y una capacidad inmunomoduladora, esta última previene los eventos inmunes mediado por las células T. Desde entonces los diferentes tipos de células troncales mesenquimales se han usado en los intentos de reparación de numerosos tejidos, tales como hueso, cartílago, músculo (incluidos cardiomiocitos), médula ósea, tendones, etc. (Caplan 2009).

En los casos, de trasplantes simples de placa de crecimiento (Escario 2008), en los que se han administrado MSC hemos observado poca respuesta inmunológica (poca presencia de linfocitos y granulocitos); acompañada, sin embargo, de una ausencia de vasos (poco efecto angiogénico). Aspecto este último, discordante con lo preconizado por Caplan. En la célula mesenquimal troncal (MSC), en relación a sus propiedades inmunológicas, se describe un efecto bimodal; esto es, esta célula tiene capacidad de disminuir y aumentar la respuesta inflamatoria e inmunológica. La respuesta inmune se produce mediante la regulación de la producción de células B, con alteraciones en los subtipos de células T, dando lugar a una inmunotolerancia del alotrasplante (Patel *et al* 2008). El problema surge cuando no se puede predecir cuál de los dos efectos expresa.

En los trasplantes combinados de cartílago y hueso, en los que no se ha administrado células MSC, se ha observado una mayor presencia de vasos así como de linfocitos y granulocitos. La angiogénesis, que expresa la presencia de nuevos vasos, creemos que es por la actividad de las células de la zona hipertrófica en producir VEGF (factor que también tiene capacidad angiogénica). La presencia de abundantes linfocitos, células plasmáticas, se justifica por la cantidad de tejido con capacidad inmunológica, y por el fallo del tratamiento inmunosupresor.

La capacidad condrogénica de las células MSC ha sido puesta en evidencia en varios laboratorios entre ellos en el nuestro (Romero-Prado *et al* 2006). Sin embargo, en los casos de placas de crecimiento trasplantadas se ha

encontrado una respuesta negativa. Se han realizado estudios experimentales de administración de células troncales pluripotenciales en reparación de lesiones de la placa de crecimiento sin éxitos evidentes (McCarty *et al* 2010, Planka *et al* 2008)

En cuanto a la respuesta osteogénica descrita en nuestros resultados, recientemente se han realizado estudios dirigidos a investigar la respuesta osteogénica tras la administración de estas células (Kabiri *et al* 2012), incluso tratándolas con una proteína ligada a un bifosfonato (Alendronato) buscando un efecto plástico, por adhesión a la trabécula ósea, pero los resultados aun no son convincentes (Guan *et al* 2012).

A tenor de los distintos resultados obtenidos mediante la administración del mismo tipo de células, en nuestro caso MSC, cabe preguntarse ¿Cómo es que la misma célula produzca respuestas tan variables? Tales como: producir un efecto o no; dar lugar a una respuesta normal o hipertrófica, o promover condrogénesis u osteogénesis.

En primer lugar la respuesta podría estar ligada a la dosis de células administradas. Nuestras dosis siempre han sido muy aproximadas entre 200- ó- 500 x 10<sup>3</sup> por animal. La dosis y la viabilidad de las células se determinan en el laboratorio en alícuotas previas, con lo cual, tras el transporte y administración, el número de células viables que llegan al lugar de administración siempre es desconocido. En esta situación, se asume que llega siempre la misma dosis.

Otra posibilidad es por la modificación de la capacidad plástica de la célula. La capacidad plástica de la célula MSC procedente de la unidad formadora de colonia, una vez administrada en el animal, que va a expresar fenotipo de tipo osteoblástico o adipocítico, por ejemplo, es compleja de determinar (Jones *et al* 2011).

Sin embargo en el análisis que se realiza en la literatura nos encontramos con varios problemas. El concepto de plasticidad hace referencia a la reprogramación que sufre una célula para diferenciarse a otro tipo celular, este proceso es conocido como trans-diferenciación (Tang *et al* 2012). En la actualidad, el proceso de plasticidad se reserva para la transdiferenciación específica de una célula aún no diferenciada (Bonfanti *et al* 2012). Es muy difícil identificar la diferenciación de la célula troncal después de la inoculación. Se

carece de un marcador específico para identificar una célula progenitora en un estadio previo a su diferenciación (Jones *et al* 2011).

Otro problema que se plantea es dónde va la célula que se administra por vía intravenosa. En el trabajo realizado por la Dra. Delgado Martos (Delgado-Martos 2010), se observó, mediante hibridación *in situ*, que las células MSC administradas no se localizaban cerca de la placa de crecimiento, sino que siempre aparecían en la médula ósea. Por esta razón, no creemos que en la placa ocurra un proceso de plasticidad. Sin embargo, la célula MSC puede actuar sobre los condrocitos de la placa por otros factores ya citados (Romero Pardo *et al* 2006).

Las células MSC se definen mediante la expresión de un fenotipo en un cultivo, y no se han encontrado marcadores de superficie para estas células universalmente aceptados (Jones *et al* 2011).

Otro aspecto que hay que tener en cuenta es que las células MSC gradualmente pierden su potencia de crecimiento de tal forma que se puede interrumpir su crecimiento; así como un proceso de senescencia. Este riesgo es mayor en aquellas células, incluso autólogas, que se inoculan puesto que hay que tener en consideración que el periodo que transcurre desde su aislamiento hasta su administración puede ser de 3-4 semanas. Recientemente se ha descrito que tras la administración de células MSC se pueden ver no solamente limitadas por su capacidad de conversión, en nuestro caso osteoblasto o condroblasto, sino que también pierden capacidad funcional por la limitación en la liberación de factores tróficos o factores de efecto paracrino. La capacidad plástica de las células con posible capacidad de orientar una respuesta osteogénica está muy limitada, por lo que se estudia asociarla a otros elementos como difosfonatos, anteriormente citados (Guan *et al* 2012).

Incluso se formula la hipótesis de que las MSC implantadas pueden actuar como “semilleros” o centros de señalización, que orquestan y organizan la respuesta del huésped a una lesión mediante las propias células multipotenciales del lecho (Jones *et al* 2011). El problema está en: 1º se sabe que la célula que se administra contiene distintos factores de crecimiento, pero no se sabe cuáles de ellos expulsa o secreta en un momento o condiciones determinadas; 2º qué tipo de respuesta da el huésped (o el nicho), y si ésta se puede controlar; aunque, todos estos aspectos aún no se conocen.

A tenor de: a) las experiencias de nuestro laboratorio en tratamientos con células MSC muestran resultados heterogéneos; b) que la plasticidad de las células, tanto en su forma como en su función, cambia su expresión en función de los cambios genéticos al encontrarse fuera de su nicho, y, de modo especial en una placa de cultivo (Delgado-Martos 2010) c) así como, aunque el uso *ex vivo* de MSC aporta alguna esperanza en la reparación de la placa de crecimiento, tanto en nuestros resultados como en los resultados en modelo de conejo, y la eficacia de los resultados de este último modelo ha sido cuestionada en un “estudio de translación” usando modelos de animales grandes (Chung 2011 *et al*); se puede concluir, al igual que otros autores (Kim 2011 *et al*), que la aplicación clínica de células MSC se encuentra todavía en un estadio precoz.

#### **Análisis de Resultados correspondientes al Segundo Objetivo: Trasplante Combinado de Placa de Crecimiento y Hueso.**

En el segundo objetivo en todos los ensayos se ha administrado un fármaco inmunodepresor.

En el **primer ensayo (Grupo E)** se realizó un trasplante combinado consistente en una región de la epífisis, placa de crecimiento y diáfisis, todo junto, de donante de 15 días. En este caso, en la epífisis se lesionaron los vasos epifisarios, puesto que, al reseca el injerto se realizó una osteotomía trans-epifisaria por debajo del plano articular, de la articulación distal del radio; de igual forma se lesionaron los vasos diafisarios al realizar la osteotomía del radio.

En este ensayo, así como en los sucesivos que se usen como donantes de diáfisis ratas de 15 días, hay que tener presente que en la estructura ósea del radio abundan una red de fibras de colágenos y de osteoblastos. En esta edad el proceso de mineralización del hueso de la diáfisis predomina sobre el proceso de osificación que ocurrirá en edades más tardías.

Al lesionar los aportes vasculares de la placa por ambos bordes, tanto por el lado epifisario como por el lado diafisario al seccionar la arteria nutricia, se pensó que conduciría a un fracaso del injerto combinado en este grupo, como así ocurrió en ambos componentes en todos los casos.

Sin embargo, llamó la atención la persistencia de segmentos de placa de crecimiento en los que se encontraba un patrón vascular a ambos lados de la placa, y se mantiene la arquitectura de la placa, así como, la presencia de células viables (como criterio de células viables siempre se ha considerado la presencia de núcleos basófilos). Sobre la placa se han encontrado restos de hueso supra-placa formado principalmente por la presencia de hueso inmaduro en el que se quedan incluidas células dentro de una laguna grande con un predominio de la relación núcleo/citoplasma, a favor del citoplasma compatible con células condrales.

La presencia de linfocitos en la médula nos hace pensar que la concentración a la que se administró el fármaco inmuno-supresor no fue correcta, posiblemente por la vía de administración subcutánea. Lo que no ha impedido que parte del injerto óseo haya fusionado con el lecho.

En el **segundo ensayo (Grupo G)**, se realizó un trasplante combinado de placa de crecimiento y de hueso, todo junto, de donante de 15 días. En este ensayo se respetan los vasos epifisarios. El injerto fracasa en todos los casos. En las epífisis tienen el mismo comportamiento que en el Grupo D, no se observa hueso supra-placa y existe un engrosamiento de las paredes óseas de los bordes laterales. El fracaso del ensayo puede ser debido tanto a causas mecánicas, por la inestabilidad de la síntesis, como a causas biológicas por reabsorción y rechazo a causa del injerto como comentaremos después al comentar el comportamiento de la diáfisis.

En algunos casos se observan restos de placa, y en un caso excepcionalmente se observa una placa fracturada. En este último caso la discontinuidad de la placa ocurre entre la zona del proliferativo e hipertrófico, y pensamos que esta fractura se produce, al no crecer esta placa y ser el hueso más corto, por la tracción que realiza el ligamento radio-cubital del cúbito (que ha seguido creciendo), que desplaza la epífisis del radio. Esta tracción del ligamento radio-cubital también ha afectado al cúbito y se manifiesta en la placa de crecimiento del cúbito en un aumento de altura en la región interna de la placa, por la ley de Hueter-Volkman.

La peculiaridad de este ensayo se encuentra en que el injerto en el momento del trasplante no tenía hueso supra-placa; y tanto en la placa conservada como en los restos de placa encontrados, se observa la presencia

de hueso supra-placa. El hueso supra-placa a su vez se acompaña de la presencia de células en la zona germinativa. En la zona donde no se encuentran células en la zona germinativa no se observa zona de hueso inmaduro del hueso supra-placa.

En los casos en los que se han observado tanto placa de crecimiento, completa o parcial, se acompañan de la presencia de hueso metafisario, así como de trabéculas irregulares entre las que se encuentra un tejido fibroso con un patrón de carácter inflamatorio y abundantes osteoclastos, lo que augura el fracaso de la placa de crecimiento. En la metáfisis no se encuentra cortical, este aspecto lo discutiremos más adelante por la importancia que tiene.

En todos los casos se ha observado ausencia de hueso diafisario. Si se recuerda que la placa de crecimiento se trasplanta junto con la diáfisis (15 días), sin un componente óseo maduro, en la que predomina tejido fibroconjuntivo con células de carácter blástico; se puede sugerir que todos los elementos de la diáfisis han sido reabsorbidos. La presencia de hueso metafisario sugiere que éste ha sido producido por la placa de crecimiento trasplantada.

En el **tercer ensayo (Grupo F)**, se realizó un trasplante combinado de placa de crecimiento y de hueso, ambos separados, de donante de 15 días. En este ensayo se respetan los vasos epifisarios. El injerto fracasa en todos los casos.

En algunos casos se observa presencia de placa de crecimiento. Las placas, que se conservan, mantienen una arquitectura celular normal así como las columnas de células. En la zona alta de la zona del proliferativo y en la zona del germinativo se observan células viables, con núcleos basófilos, que tienen la peculiaridad de presentar numerosos nucléolos centrales en sus núcleos lo que traduce una alta actividad de síntesis proteica. La presencia de estas células es indicativa de que en esta zona se produce gran actividad en el núcleo, responsable presumiblemente de una actividad de tipo ribosómico.

Debajo de la placa de crecimiento trasplantada se observa presencia de metáfisis, con trabéculas metafisarias con escasos ribetes osteoblásticos, abundantes vasos y presencia de células mononucleadas. En la metáfisis no se observa cortical metafisaria, al igual que en el ensayo anterior que se analizará más adelante.



Al igual que el ensayo anterior se encuentra ausencia de la diáfisis que podemos justificar por la misma causa que en el ensayo anterior.

En el **cuarto ensayo (Grupo C-A)**, se realizó un trasplante combinado de placa de crecimiento y de hueso, ambos separados. Donante de placa de crecimiento de 15 días; donante de hueso de un mes. *En este ensayo se respetan los vasos epifisarios.* En este ensayo es importante observar la edad de toma de injerto de la diáfisis, que es de un mes, lo que implica que ha aumentado la masa ósea y predomina la osificación sobre la mineralización.

En este ensayo se observa que la zona trasplantada ha crecido, y la placa crecimiento del radio se encuentra al mismo nivel que la placa del cúbito, lo que implica que el hueso ha crecido en longitud por el proceso de osificación endocondral. La morfología de la placa mantiene una arquitectura normal. Esta se acompaña de la presencia de metáfisis y diáfisis que se continúan sin solución de continuidad con el hueso del lecho. Se plantea el problema de saber si esta diáfisis es la originalmente trasplantada o ha sido producido por la placa trasplantada.

Se ha realizado un estudio histométrico de la placa de crecimiento en el Grupo C (uniendo algunos casos del grupo C-A y C-B) y se ha comparado con el estudio histométrico realizado en un grupo de casos control.

La histometría de la placa de crecimiento del grupo C (casos de C-A y C-B unidos) nos muestra que: la placa de crecimiento en el Grupo C tiene menos altura que el control, y sin embargo es más ancha que en grupo control. Aquí nos encontramos con una paradoja y es que en los cortes histológicos la placa del cúbito y del radio se encuentran a la misma altura, y la altura de la placa de crecimiento trasplantada del radio es menor que la altura de la placa de crecimiento del control. Esto nos sugiere que si bien durante el ensayo las placas han crecido hasta coincidir en altura, puede ser que en lo que nosotros hemos considerado tiempo final de ensayo la placa trasplantada haya alcanzado el límite de crecimiento. Es decir; si hubiéramos prolongado el tiempo de ensayo, la placa del radio estaría a menos altura que la del cúbito. Esto nos sugiere que quizás en próximos ensayos haya que estimular de alguna forma mediante algún factor de crecimiento las células de la placa.

El segundo problema que nos muestra la histometría es el aumento en la anchura de la placa de crecimiento trasplantada con respecto a la placa de crecimiento control, esto se acompaña de una atrofia o hipotrofia del anillo pericondral. En la literatura se ha sugerido que el anillo pericondral es responsable del crecimiento en anchura de la placa por aposición de células al mismo (Solomon *et al* 1966, Shapiro *et al* 1977).

Estudios en nuestro laboratorio han sugerido que el crecimiento lateral de la placa no era por aportación de células por el anillo pericondral; sino por el aumento de columnas de condrocitos en las zonas laterales de la placa (Miralles-Flores y Delgado-Baeza 1988). Los resultados del grupo C nos muestra de una forma evidente, y ante la ausencia de función del anillo pericondral, que la placa de crecimiento crece por la aportación de condrocitos por la zona lateral de la placa. A esta evidencia se podía añadir que una de las funciones del anillo pericondral es la contención del crecimiento en anchura de la placa de crecimiento. Este efecto mecánico de la placa de crecimiento se cita en la literatura pero nunca se ha justificado el por qué, o de forma más clara, en qué consistía este efecto.

Sin embargo, se han encontrado una serie de problemas. En un caso, se ha observado que el hueso ha crecido menos y que la placa de crecimiento se encontraba a un nivel inferior de la placa de crecimiento con respecto al cubito. La expresión morfológica de esta placa tiene un predominio de células hipertróficas, con disminución de columnas y células en la zona proliferativa. Esta imagen de la placa de crecimiento, nos referimos sólo a este caso, recuerda a la imagen descrita de una placa expandida a base de células del hipertrófico descrita con anterioridad en el ensayo del grupo en fresco. Incluso podría tener la misma discusión. Sin embargo este caso particular presenta, al igual en resto de este grupo, una región metafisaria con presencia de trabéculas y vasos en la zona condro-metafisaria, lo cual lo diferencia del hallazgo, de placa expandida, descrito en el grupo de trasplante de placa de crecimiento en fresco en la que no se observaron vasos. Esto sugiere que en este ensayo se ha expresado VEGF en las células del hipertrófico; y que, quizás es posible que el fallo de la placa se encuentre en el eje PTHrP-Ihh, en el fallo en las células del anillo pericondral como emisoras de mensajes PTH a la placa, o en fallo del eje C/EBP-CHOP, aunque por el momento carecemos de evidencias.

### **Análisis del patrón vascular**

En los casos descritos en este ensayo, en la placa de crecimiento se encuentran un amplio patrón vascular tanto en la zona correspondiente al germinativo (vasos epifisarios), así como en la zona metafisaria (vasos metafisarios); lo que indica la existencia de un proceso de angiogénesis.

En el injerto osteo-condral, al igual que en el injerto óseo, hay que tener presente el requerimiento del injerto de necesitar un íntimo contacto con el lecho receptor, necesario para la penetración de vasos y, por ende, de que ocurra el proceso penetración de células en el hueso y se produzca el proceso de osteogénesis (más frecuente por el procedimiento de aposición sobre antiguas trabéculas que por el de sustitución de las mismas). Sin embargo, en nuestro ensayo partimos, dada la imposibilidad por el momento de realizar una fijación de la placa, del hecho de que la placa es inestable lo que daría lugar a una dificultad del proceso de angiogénesis. Aunque desconocemos el proceso íntimo de angiogénesis que ocurre en el presente ensayo; sí podemos deducir que el tiempo de viabilidad de la placa se ha mantenido en un primer tiempo tanto por su capacidad metabólica en hipoxia como de ser nutrida por el fluido tisular, aunque carecemos de evidencia de cuánto dura este tiempo.

En un primer tiempo del injerto, ¿son necesarios los vasos epifisarios y metafisarios para la viabilidad de la placa de crecimiento? A tenor de los resultados que se exponen, parece que la respuesta es no. Entonces ¿cómo se nutre la placa de crecimiento? La respuesta obvia es por imbibición; sin embargo esta respuesta parece incorrecta en la actualidad.

Farnum (Farnum *et al* 2006), en un elegante trabajo, mediante la administración de una sustancia fluorescente en rata, describe la presencia de un plexo “vascular” periférico en la placa de crecimiento, que llega alcanzar la región central de la placa, que quizá participa en la nutrición de la placa y aporte de factores paracrinos. Dado que no encuentra una razón lógica de su hallazgo, sugiere que la sustancia fluorescente pasa de los vasos y del plexo a la placa de crecimiento. Como segunda opción propone la existencia de unas anastomosis entre los sistemas vasculares de la placa, que por otro lado no encuentra. En el estudio descriptivo de sus resultados, acompañado de figuras, se observa que la sustancia fluorescente penetra en la placa configurando un retículo, paso último que no explica la autora.

Cajal (Cajal 1910), escribe: “Cuando, á ejemplo de ciertos autores, se observan en el alcohol, finos cortes de cartílago joven, la materia fundamental se muestra cruzada en ciertos sitios por unos hacecillos relativamente espesos que llamaremos, por alusión á su probable oficio, fibras permeables. El curso de estas fibras varía algo en las diversas zonas del cartílago: así si nos fijamos en la capa periférica de un cartílago costal, dichas fibras aparecen orientadas en un sentido radial, arrancando del pericondrio y marchando hacia adentro para terminar en el espesor de las primeras cápsulas; en las zonas centrales, la orientación es muy otra, pues las fibras permeables constituyen manojos que, irradiando de una cápsula se terminan en la de los vecinos elementos.

*La naturaleza y significación de las fibras permeables dista mucho de estar esclarecidas. No son, pues, conductitos preexistentes llenos de plasma, como creían Bubnoff y Budge, por cuanto jamás se muestran en los cortes finos de cartílago bajo la forma de agujeros; pero representan substancialmente la misma disposición, pues á lo largo de dichas fibras se filtran los jugos absorbidos en el pericondrio, y gracias á ellas puede llegar nutrimento hasta las células cartilaginosas, que son las más alejadas de la fuente vascular*”. Se ha mantenido la extensión de la cita, por la minuciosa descripción de Cajal.

A la luz de la descripción de Cajal, se puede interpretar que el hallazgo de Cornelia Farnun confirma lo descrito por Cajal. La placa de crecimiento se nutre por vasos epifisarios y metafisarios; y, además, por un plexo, que demuestra Farnun, pero que no necesita anastomosis con otros vasos, como sugiere esta autora, y que participa en llevar nutrientes o factores a las zonas más íntimas de la placa. Al no tener evidencia de que existen vasos de conexión, y de que sí existe un proceso nutrición, la única solución que encontramos es que el sistema descrito por ambos autores coja los nutrientes, productos paracrinos, etc., del tercer espacio. Y, gracias a las *fibras permeables* de Cajal estos productos son transportados a las *células cartilaginosas, que son las más alejadas de la fuente vascular*. Esto nos sugiere que el plexo descrito por Cornelia Farnun corresponde a las *fibras permeables* de Cajal. Y, mediante este sistema, pensamos, en los ensayos realizados en este trabajo, la placa de crecimiento trasplantada y colocada en un fluido tisular se asegura la nutrición hasta la llegada posterior de los vasos.

En la metáfisis se encuentran abundantes trabéculas óseas entre las cuales se encuentra un patrón de médula ósea con un predominio abundante de células linfocitarias, histiocíticas, granulopoyéticas, etc. Aquí nos encontramos con dos problemas; el primer problema, el patrón celular descrito traduce un fracaso del tratamiento inmuno-supresor discutido con anterioridad. El segundo problema, es la presencia del hueso metafisario. Los cortes histológicos muestran que el hueso metafisario se produce a través de la osificación endocondral de la placa la placa de crecimiento. En cuanto al aporte de células osteoblásticas es evidente que proceden del lecho, a partir de las aportaciones de Trueta (Trueta *et al* 1960).

En la metáfisis no se ha observado cortical metafisaria. Se desconoce el origen de la cortical metafisaria. Dado que en este ensayo se colocó hueso diafisario, cualquier especulación sobre la cortical de la metáfisis o de la diáfisis se puede ver artefactada. Esto motivó la realización del último ensayo.

*En el quinto ensayo (Grupo C-B), se realizó un trasplante combinado de placa de crecimiento y de hueso, ambos separados. Donante de placa de crecimiento de 15 días; donante de hueso de tibia, de rata de tres meses, hueso macerado.*

En el análisis radiológico, lo primero que llamó la atención en estos ensayos (Grupo C-A y C-B) fue la presencia de hueso diafisario; sobre todo en el Grupo C-B, en el que no se había trasplantado hueso de la diáfisis. De ambos grupos, la presencia de cortical en la diáfisis fue más notable en el Grupo C-B. Sin embargo, en el estudio histológico no encontramos imágenes de una cortical metafisaria ósea. Nos encontramos así con una disociación radiológica e histológica en cuanto a la valoración de la cortical metafisaria, quizá la tinción con técnica de histoquímica de calcio, von Kossa, ayude a resolver la disociación.

En este ensayo nos interesa resaltar que, en el corte histológico, la placa de crecimiento del radio está en el mismo nivel que la placa de crecimiento del cubito, lo que significa que ambos huesos han crecido. Esto lo primero que traduce es que la placa de crecimiento ha funcionado, al menos hasta el periodo final del ensayo, y se acompaña a su vez de un patrón vascular en ambos lados de la placa.

Sin embargo en el corte histológico llama la atención, que a pesar de este crecimiento normal se observa una fractura de la placa en todos los casos, y no artefacto, a través de la placa de crecimiento, en la zona proliferativa. Esta fractura se identifica por la discontinuidad morfológica en ambas partes, así como por la basofilia intensa en los bordes de la lesión. Si hubiera sido una fractura antigua hubiera afectado al crecimiento longitudinal del hueso; lo que nos hace suponer que la causa de la lesión es reciente aunque desconocemos los mecanismos.

### **Análisis de la cortical y trabéculas**

La presencia de la Metáfisis es uno de los aspectos, entre otros, que ha interesado en este ensayo. Podemos establecer una relación íntima entre la placa de crecimiento y la presencia de trabéculas en la metáfisis, lo que es indicativo de que la placa de crecimiento participa en el proceso inicial de la osificación endocondral, a partir de las columnas del hipertrófico; en las se presupone la liberación de VEGF, entre otros factores, y además traduce que se produce el proceso de liberación de vesículas con los componentes de fosfato cálcico, y el proceso de mineralización subsiguiente.

Más tarde con la llegada de las células mesenquimales perivasculares, descritas por Trueta (Trueta *et al* 1960) (así como de otras células que desconocemos que podrían ser las iniciadoras del proceso de vasculogénesis), y de los osteoclastos procedentes de tejido hematopoyético, se inicia la formación de trabéculas secundarias. En estas trabéculas aparece un ribete de células osteoblásticas, con la peculiaridad de que en las osteonas de las trabéculas se observan en una orientación incorrecta. Por orientación incorrecta entendemos la formación de trabéculas por un conjunto de “nódulos óseos” de una sola osteona en la que se observa un vaso y una célula central en un corte sagital, lo que no es habitual en la preparación histológica normal. Esta observación la hemos encontrado descrita en los diferentes trasplantes realizados tanto de placa simple como de combinado con hueso. La mala orientación de las osteonas se debe a un defecto de transferencia de carga en esta región (Tanck 2006).

Ha llamado la atención en estos dos últimos grupos la abundante presencia de vasos en la zona de la médula ósea. Con respecto al efecto secundario de la población de células óseas, se ha descrito que la hipoxia

celular en los condrocitos es un fuerte estímulo para la hiperemia a nivel local de los tejidos (Dood 1999).

Al igual que en el grupo anterior (C-A), en la metáfisis no se observa cortical en el corte histológico. La ausencia de cortical metafisaria se puede interpretar por la ausencia de carga, puesto que según algunos autores el hueso cortical que se desarrolla debajo de la placa de crecimiento es regulado por una transferencia de carga (Tanck *et al* 2006). Algunos autores sugieren que la cortical metafisaria se forma por la coalescencia de trabéculas óseas endocondrales. Sugieren que esta coalescencia se debe al aumento de la superficie de masa celular, o del número de osteoblastos, en la esponjosa periférica. En coherencia con este posible mecanismo, algunos autores describen sus hallazgos en los cuales el periostio producen un factor soluble que estimula la proliferación de osteoblastos *in vitro* (Cadett *et al* 2003). Las células del periostio responden a un nivel fisiológico de fuerzas mecánicas mediante un aumento de la proliferación celular, y liberación de proteínas con un efecto anabólico de formación ósea. (Gosman *et al* 2011) La ausencia de periostio en estos casos, junto con el de la carga mecánica, puede ser un factor añadido que justifica la ausencia de cortical metafisaria.

La cortical de un hueso normal tiene dos fases en su desarrollo: fase de mineralización y fase de osificación. En la fase de osificación, la cortical es una estructura compleja en su morfología y heterogénea en su estructura. En ella se pueden describir los siguientes componentes: periostio, participa en formar hueso laminar; canales de Volkmann (longitudinales); canales de Havers (transversales); y, endostio (forma hueso laminar). En el hueso normal se ha encontrado descrita la microestructura de la cortical en función del tipo de osteonas presentes y de la edad (Streeter *et al* 2010).

En este trabajo se ha analizado el comportamiento de las estructuras de la cortical diafisaria como respuesta a la intervención realizada. Se describen cuatro fases de la lesión de la cortical. Al inicio de la lesión, presumiblemente de origen mecánico, la cortical responde de dentro afuera, quizá porque dentro de la cortical se encuentran los canales de Volkmann, en la que se encuentran vasos y células acompañantes responsables, quizá, de la primera respuesta. En las primeras fases se forma hueso inmaduro, más tarde aparecen osteonas primarias con pérdida del eje, para acabar con lesión en las zonas externa.



Pensamos que estas observaciones iniciales son muy precoces, y que en un futuro requieren estudios más detallados.

Si regresamos al grupo que estamos analizando (grupo C-B), en él no se colocó ningún injerto diafisario que pudiera incorporarse al lecho. En este ensayo se observó hueso diafisario neo-formado entre la placa de crecimiento y el injerto de tibia macerado (que fue retirado). El hueso diafisario se ha observado que se forma a partir de una coalescencia de trabéculas, formadas por hueso lamelar procedentes de la metáfisis. La coalescencia de estas trabéculas se produce fundamentalmente en las regiones laterales dando lugar a la diáfisis. Estas trabéculas se unen entre sí mediante una discreta formación de hueso inmaduro.

Entre la trabéculas se forman espacios que son ocupados por médula ósea. En la médula ósea se observa la presencia de tejido hematopoyético con predominio de linfocitos células plasmáticas polimorfonucleares, etc. con presencia de vasos.

Llama la atención, que la fusión de las trabéculas no haya sido en una masa sólida; sino que, al parecer, ha ocurrido un proceso que en la clínica se conoce como “tubulización”. La “tubulización” es un proceso descrito en la imagen radiográfica. El proceso de “tubulización” se describe en clínica en los casos en los que un amplio espacio de defecto de la diáfisis es sustituido por injertos óseos y al cabo de un tiempo aparece, en la imagen radiográfica, el espacio correspondiente de la médula ósea; y por ende, aparecen las imágenes de las corticales del hueso, se completa así la imagen de un tubo. El fenómeno de “tubulización” en clínica se observa cuando en procesos en los cuales hay un defecto grande de cortical esta se ha sustituido por hueso injertado, y también cuando el defecto diafisario se ha tratado mediante técnicas de transporte óseo. Tras la realización de estas técnicas se produce un proceso de osteogénesis, que regenera el hueso, junto a un proceso de remodelación del hueso conocido como “tubulización” mediante el cual se recupera el canal correspondiente a la médula ósea. Llama más la atención que este proceso se suele explicar secundario a la aplicación de fuerzas sobre el injerto mediante la carga; cuando precisamente en nuestro caso, interpretamos, que la carga ha sido mínima. Así mismo, el proceso de “tubulización” de la diáfisis se ha justificado en la literatura, a partir del efecto inducido de canalización realizado por la barra ósea del anillo pericondral (Shapiro *et al* 1977). Sin embargo, la observación de que en las

diáfisis de estos trasplantes se encuentre un espacio medular dentro de un cilindro óseo en ausencia de un anillo pericondral funcional, nos sugiere que hay otro proceso, que desconocemos, en la formación de la diáfisis en nuestro ensayo.

### **Análisis de hueso supra-placa**

En nuestro ensayo se han realizado las siguientes observaciones: Primero, si se extrae la placa de crecimiento, el hueso supra-placa no aparece en la epífisis. Segundo, la ausencia de células en la zona germinativa, se asocia con la ausencia de hueso inmaduro en el hueso supra-placa. Tercero, las células del germinativo presentan una tendencia a ocupar espacios de la epífisis más allá de la placa de crecimiento. Cuarto, estas células se observan inmersas en una matriz condral, basófila o eosinófila, dentro de una laguna; estas células presentan alteraciones citoplasmáticas y ruptura nuclear de forma progresiva conforme se alejan de la zona germinativa. Quinto, las zonas de matriz y células, descritas en el apartado anterior, se acompañan en la periferia de la presencia de hueso inmaduro.

Estas observaciones nos recuerdan a la formación ósea endocondral que ocurre en la zona metafisaria, pero que en vez de ocurrir en una arquitectura columnar ocurren en un plano superficial. Lo único que no hemos observado son células multinucleadas (osteoclastos), que sí se observan en la zona metafisaria; pero sabiendo que los osteoclastos también pueden ser células mononucleares se requiere realizar la técnica de tinción de osteoclastos para su confirmación.

En la zona hipertrófica de la placa de crecimiento se acepta que los condrocitos mueren por apoptosis (Roach *et al* 2004, Martos-Rodríguez *et al* 2003) Sin embargo, hemos observado que los condrocitos de la zona germinativa que se desplazan hacia la zona del hueso supra-placa mueren por un proceso de cariólisis. La cariólisis define a un proceso de muerte celular caracterizado por disminución y pérdida de la basofilia nuclear, producida ésta por degradación inespecífica del DNA; a su vez la desnaturalización de las proteínas conducen a una aumento de la eosinofilia del citoplasma. Desconocemos las causas de esta diferencia de tipo de muerte celular con respecto a los condrocitos de la zona hipertrófica que mueren por apoptosis.

Todo ello nos sugiere que en la placa existen dos frentes de osificación endocondral. 1) Uno, en la metáfisis, en las que se produce una osificación en columnas que van a dar lugar a las trabéculas metafisarias. 2) Otro, en la epífisis, sobre la zona germinativa con una arquitectura de placa ósea, paralela al eje transversal de la placa de crecimiento; formada primero por hueso inmaduro, el más próximo a la placa y seguida de un hueso laminar. Lo que justifica que tras la resección de la placa desaparece el hueso supra-placa, y en los trasplantes de placa en los que la zona germinativa está presente vuelve a aparecer.

Se ha comparado este tipo de osificación con el proceso de osificación que ocurre en la placa ósea subcondral situada en las articulaciones. En el tejido conectivo articular se describe una línea de limitación (tide mark) entre la zona radial baja y la zona de calcificación, en la zona de calcificación las células tienen núcleos basófilos, y se observa una solución de continuidad entre esta zona y el hueso epifisario. En el hueso supra-placa no se observa ninguna imagen similar a las descritas en el cartílago articular. Desconocemos las causas de estas diferencias.

¿Por qué aparece el hueso supra-placa en esta zona? En la actualidad lo desconocemos. Ahora bien, en un trabajo anterior realizada en nuestro laboratorio (Santos del Riego 1998), se describía que el hueso (nos referíamos a la región de la placa de crecimiento, en particular) se opone por medio de fuerzas, a las fuerzas externas que se ejercen, mediante tres respuestas internas: Fuerzas cortantes, fuerzas axiales y momento flectores. Las fuerzas cortantes son las fuerzas que actúan sobre el hueso y tienden a cizallarlo. Estas fuerzas se van a distribuir, normalmente, paralelas al plano de la placa de crecimiento. Las fuerzas axiales, producen tracción y compresión en la placa, y pueden contribuir a cizallarla. Momento flector, el momento flector se define como una fuerza por una distancia, que aumenta en la zona de compresión.

Si se aplica el paradigma de Tenseguridad (Chen *and* Inberg 1991), se puede entender que la presencia del hueso supra-placa (tejido óseo), a modo de un tensor, libere a la placa de crecimiento (tejido blando gelatinoso) de las respuestas internas a las fuerzas externas. En el caso de aumentar las fuerzas externas aumentan también las fuerzas internas de respuesta, y, como consecuencia, se produce la lesión de la placa de crecimiento. Los mecanismos

íntimos de cómo la placa induce o estimula la formación del hueso supra-placa, moléculas de señalización, etc, los desconocemos.

Los múltiples problemas analizados en este trabajo, realizado en el campo de la histología, dejan más preguntas que respuestas; lo que motiva seguir los trabajos en distintas direcciones, dentro de la misma línea de investigación.

## **7 CONCLUSIONES**

Tras la realización y análisis del trabajo titulado “Placa de crecimiento: alotrasplante simple y alotrasplante combinado con hueso. Modelo experimental en rata.”, se extraen las siguientes conclusiones:

1º. El alotrasplante de placa de crecimiento simple, crío-conservado o no, no tratado o tratado con células mesenquimales pluripotenciales en rata, fracasa.

2ª. El alotrasplante de placa de crecimiento combinado con un alotrasplante de hueso diafisario maduro, ambos separados por un espacio, en un medio sero-hemático, permanece viable hasta las 12 semanas post-trasplante. Por ello puede ser considerado como un modelo experimental en rata.

## **8 RESUMEN**



La Hipótesis del trabajo se fundamenta en que la placa de crecimiento, como todo cartílago, puede ser viable en lecho en un medio sero-hemático. Los Objetivos que se proponen son: 1º Analizar la viabilidad del alotrasplante de la placa de crecimiento simple, crío-conservado o en fresco, tratado con células MSC. 2º Analizar la viabilidad del alotrasplante combinado de placa de crecimiento y hueso. En el trasplante combinado se incluyen dos posibilidades: placa de crecimiento y hueso unidos; y, placa de crecimiento y hueso separados. En el planteamiento, en un modelo experimental en rata, se propone realizar aloinjerto de placa de crecimiento simple, crío-conservado o no, no tratadas y tratadas con células MSC; así como un trasplante combinado de placa de crecimiento y hueso, ambos separados. Como Método se propone realizar un estudio radiológico e histológico de los especímenes trasplantados. Tras evaluar los resultados se extraen las siguientes Conclusiones: 1º El alotrasplante de crecimiento simple, crío-conservado o no, no tratado o tratado con células MSC, fracasa. 2ª El alotrasplante de placa de crecimiento combinado con un alotrasplante de hueso diafisario maduro, ambos separados por un espacio en un medio sero-hemático, permanece viable hasta las 12 semanas post-trasplante. Por ello, este último, puede ser considerado como un modelo experimental en rata.

## **9 BIBLIOGRAFÍA**

Abad V, Meyers JL, Weise M, Gafni RI, Barnes KM, Nilsson O, Bacher JD, Baron J. The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology*. 2002 May; 142(5): 1851-7.

Adams CS, Shapiro IM. The fate of the terminally differentiated chondrocyte: evidence for microenvironmental regulation of chondrocyte apoptosis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002. 13, 465-473.

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb;105(4):1815-22.

Aharinejad S, Marks SC Jr, Bock P, MacKay CA, Larson EK, Tahamtani A, Mason-Savas A, Firbas W. Microvascular pattern in the metaphysis during bone growth. *Anat Rec*. 1995; 242:111-22.

Alvarez J, Costales L, Serra R, Balbín M, López JM. Expression patterns of matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factor during epiphyseal ossification. *J Bone Miner Res*. 2005 Jun; 20(6):1011-21.

Alvarez J, Horton J, Sohn P, Serra R. The perichondrium plays an important role in mediating the effects of TGF-beta1 on endochondral bone formation. *Dev Dyn*. 2001 Jul; 221(3):311-21.

Anderson HC, Sipe JB, Hessle L, Dhanyamraju R, Atti E, Camacho NP & Millan JL Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *Am J Pathol* 2004; 194, 841-847.

Anderson HC. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol* 1969; 41, 59-72.

Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Relat Res*. 1995 May;(314):266-80.

Anderson HC, Mulhall D, Garimella R. Role of extracellular membrane vesicles in the pathogenesis of various diseases, including cancer, renal diseases, atherosclerosis, and arthritis. *Lab Invest*. 2010 Nov;90(11):1549-57.

Ballock RT, Heydemann A, Wakefield LM, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB. TGF-beta 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene

expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases. *Dev Biol.* 1993;158:414-29.

Ballock RT, Mink LM, Chen DHC, Mita BC. Thyroid hormone regulates terminal differentiation of growth plate chondrocytes through local induction of bone morphogenetic proteins. *Trans Orthop Res Soc.* 2000;25:160.

Ballock RT, O'Keefe RJ. The biology of the growth plate. *J Bone Joint Surg Am.* 2003 Apr;85-A(4):715-26.

Ballock RT, Zhou X, Mink LM, Chen DH, Mita BC. Both retinoic acid and 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> inhibit thyroid hormone-induced terminal differentiation of growth plate chondrocytes. *J Orthop Res.* 2001 Jan;19(1):43-9.

Bonfanti P, Barrandon Y, Cossu G. 'Hearts and bones': the ups and downs of 'plasticity' in stem cell biology. *EMBO Mol Med.* 2012 Mar 2. doi: 10.1002/emmm.201200220. [Epub ahead of print].

Bowen CV, Ethridge CP, O'Brien BM, Frykman GK, Gumley GJ. Experimental microvascular growth plate transfers. Part I--Investigation of vascularity. *J Bone Joint Surg Br.* 1988 Mar;70(2):305-10.

Boyan BD, Sylvia VL, Dean DD, Del Toro F, Schwartz Z. Differential regulation of growth plate chondrocytes by 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 24R,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> involves cell-maturation-specific membrane-receptor-activated phospholipid metabolism. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(2):143-54.

Boyer MI, Danska JS, Nolan L. Microvascular transplantation of physeal allografts. *J Bone Joint Surg Br* 1995; 77(5):806–14.

Boyer MI, Bowen CV. Microvascular transplantation of epiphyseal plates: studies utilizing allograft donor material. *Orthop Clin North Am.* 2007 Jan;38(1):103-8, vii.

Bray PW, Neligan PC, Bowen CV. Survival of microvascular physeal allograft transplants following withdrawal of short-term postoperative immunosuppression. *J Bone Joint Surg [Am]* 2004; 86-A(2):281–9.

Brighton CT. Growth plate. *Rheum Dis Clin North Am.* 1987 Apr;13(1):75-100.

Brighton CT. The growth plate. *Orthop Clin North Am.* 1984 Oct;15(4):571-95.

Brighton CT. Longitudinal bone growth: the growth plate and its dysfunctions.

Brochhausen C, Lehmann M, Halstenberg S, Meurer A, Klaus G, Kirkpatrick CJ. Signalling molecules and growth factors for tissue engineering of cartilage-what can we learn from the growth plate? *J Tissue Eng Regen Med*. 2009 Aug;3(6):416-29.

Buckwalter JA, Mower D, Ungar R, Schaeffer J, Ginsberg B. Morphometric analysis of chondrocyte hypertrophy. *J Bone Joint Surg Am*. 1986 Feb;68(2):243-55.

Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 2007 Nov;213(2):341-7.

Caplan AI. New era of cell-based orthopedic therapies. *Tissue Eng Part B Rev*. 2009 Jun;15(2):195-200.

Chen CS, Ingeber DE. Tensegrity and mechanoregulation: from skeleton to cytoskeleton. *Osteoarthritis and Cartilage*. 1991; 7: 81-94.

Chung R, Foster BK, Xian CJ. Preclinical studies on mesenchymal stem cell-based therapy for growth plate cartilage injury repair. *Stem Cells Int*. 2011. 570-575.

D'Angelo M, Billings PC, Pacifici M, Leboy PS, Kirsch T. Authentic matrix vesicles contain active metalloproteases (MMP). a role for matrix vesicle-associated MMP-13 in activation of transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*. 2001 Apr 6;276(14):11347-53.

Deckers MM, Van Beek ER, Van Der Pluijm G, Wetterwald A, Van Der Wee-Pals L, Cecchini MG, Papapoulos SE & Lowik CW Dissociation of angiogenesis and osteoclastogenesis during endochondral bone formation in neonatal mice. *J Bone Miner Res* 2002. 17, 998-1007.

DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A 1991 Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 64, 849-859.

Delgado-Baeza E, Giménez-Ribotta M, Miralles-Flores C, Nieto-Chaguaceda A, Santos-Alvarez I. Growth of the perichondrium and the chondroepiphysis: experimental approach in the rat proximal tibial epiphysis. *Acta Anat (Basel)*. 1992;145(3):195-200.

De las Heras J, Delgado-Baeza E. Massive bone allografts in children's tumor Surgery: *J Bone Joint Surg Br*. 2001, 83 B Sup II.

Dood JS, Raleigh JA; Gross TS. Osteocyte hypoxia: a novel mechanotransduction pathway *Am. J. Physiol.* 277(Cell Physiol. 46): C598-C602, 1999.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.

Donski PK, Carwell GR, Sharzer LA. Growth in revascularized bone grafts in young puppies. *Plast Reconstr Surg* 1979;64(2):239-43.

Donski PK, O'Brien BM. Free microvascular epiphyseal transplantation: an experimental study in dogs. *Br J Plast Surg* 1980;33(2):169-78.

Donohue MM, Demay MB. Rickets in VDR null mice is secondary to decreased apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Endocrinology*. 2002 Sep;143(9):3691-4.

Eades JW, Peacock EE Jr. Autogenous transplantation of an interphalangeal joint and proximal phalangeal epiphysis. Case report and ten-year follow-up. *J Bone J Surg* 1966;48A:775-778.

Egli RJ, Sckell A, Fraitzl CR, Felix R, Ganz R, Hofstetter W, Leunig M. Cryopreservation with dimethyl sulfoxide sustains partially the biological function of osteochondral tissue. *Bone*. 2003 Sep;33(3):352-61.

Emons J, Chagin AS, Hultenby K, Zhivotovsky B, Wit JM, Karperien M & Savendahl L. Epiphyseal fusion in the human growth plate does not involve classical apoptosis. *Pediatr Res* 2009. 66, 654-659.

Escario, A. Células madre como nueva terapia biológica aplicada en el trasplante osteocondral. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 2008.

Falchuk KH, Goetzl EJ, Kulka JP. Respiratory gases of synovial fluids. An approach to synovial tissue circulatory-metabolic imbalance in rheumatoid arthritis. *Am J Med*. 1970 Aug; 49(2):223-31.

Farnum CE, Lenox M, Zipfel W, Horton W, Williams R. In vivo delivery of fluoresceinated dextrans to the murine growth plate: imaging of three vascular routes

by multiphoton microscopy. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2006 Jan;288(1):91-103.

Farnum CE, Wilsman NJ:. Cellular turnover at the chondro-osseous junction of growth plate cartilage: analysis by serial sections at the light microscopical level. *J Orthop Res* 1989. 7:654–666.

Ferrer E, De las Heras J, Delgado-Baeza E. Allografts in reconstructive surgery in Pediatric Patients. *American Academy of Orthopedic Surgeons*. 2009.

Fuster, A. Alotransplante de placa de crecimiento: estudio experimental en ratas. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina. 2004.

Gartland A, Mason-Savas A, Yang M, MacKay CA, Birnbaum MJ & Odgren PR. Septoclast deficiency accompanies postnatal growth plate chondrodysplasia in the toothless (tl) osteopetrotic, colony-stimulating factor-1 (CSF-1)-deficient rat and is partially responsive to CSF-1 injections. *Am J Pathol* 2009. 175, 2668-2675.

Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development*. 1999 Mar;126(6):1149-59.

Gibson G Active role of chondrocyte apoptosis in endochondral ossification. *Microsc Res Tech* 1998. 43, 191-204.

Gimenez-Ribotta M. Canales condrales. Aportación experimental a su morfogénesis en la rata. Tesis doctoral Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina 1998.

Glickman AM, Yang JP, Stevens DG, Bowen CV. Epiphyseal plate transplantation between sites of different growth potential. *J Pediatr Orthop*. 2000 May-Jun;20(3):289-95.

Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop Relat Res*. 1987 Dec;(225):7-16.

Gosman et al. Yearbook of physical anthropology 54:86-98 2011.

Graham WC. Transplantation of joints to replace diseased or damaged articulations in the hand. *Am J Surg*. 1954;88:136–141.



Grimsrud CD, Romano PR, D'Souza M, Puzas JE, Schwarz EM, Reynolds PR, Roiser RN, O'Keefe RJ. BMP signaling stimulates chondrocyte maturation and the expression of Indian hedgehog. *J Orthop Res*. 2001 Jan;19(1):18-25.

Guan M, Wei Y. Directing mesenchymal stem cells to bone to augment bone formation and increase bone mass. *Nature Medicine* Vol18, Number 3 2012 pp 456-462.

Harris R, Martin R, Tile M. Transplantation of epiphyseal plates. *J Bone Joint Surg Am* 1965; 47:897-914.

Hert J. Growth of the epiphyseal plate in circumference. *Acta Anat (Basel)*. 1972;82(3):420-36.

Hunziker EB, Schenk RK. Physiological mechanisms adopted by chondrocytes in regulating longitudinal bone growth in rats. *J Physiol*. 1989 Jul;414:55-71.

Hunziker EB, Schenk RK, Cruz-Orive LM. Quantitation of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth. *J Bone Joint Surg Am*. 1987 Feb;69(2):162-73.

Ihara K, Doi K, Sakai K, Yamamoto M, Kanchiku T, Kawai S. Vascularized fibular graft after excision of giant cell tumor of the distal radius. A case report. *Clin Orthop Relat Res*. 1999 Feb;(359):189-96

Iannotti J. Growth plate physiology and pathology. *Orthop Clin North Am*. 1990 21:1-1.

Innocenti M, Delcroix L, Manfrini M. Vascularized proximal fibular epiphyseal transfer for distal radial reconstruction. *J Bone Joint Surg [Am]* 2005; 87(Suppl 1 Pt 2):237-46.

Iannotti JP, Goldstein S, Kuhn J, Kaplan FS, Zaleske DJ. The formation and growth of Skeletal Tissue. In: Joseph A. Buckwalter. Simon Eds. *Orthopedic Basic Science, Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System*. American Academy of Orthopedic Surgeons USA. 2000; 77-109.

Jones E, Yang X. Mesenchymal stem cells and bone regeneration: current status. *Injury*. 2011 Jun;42(6):562-8.

Kabiri M, Kul B, Lott WB, Futrega K, Ghanavi P, Upton Z, Doran MR. 3D mesenchymal stem/stromal cell osteogenesis and autocrine signalling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Mar 9;419(2):142-7. Epub 2012 Jan 1.

Kato Y, Iwamoto M. Fibroblast growth factor is an inhibitor of chondrocyte terminal differentiation. *Biol Chem*. 1990 Apr 5;265(10):5903-9.

Kim S-J. Stem cell research in orthopaedic and trauma surgery. *Orthopedics and trauma*. 2011 25:168-173.

Kishimoto K, Kitazawa R, Kurosaka M, Maeda S, Kitazawa S. Expression profile of genes related to osteoclastogenesis in mouse growth plate and articular cartilage. *Histochem Cell Biol* 2006. 125, 593-602.

.Kronenberg HM, Lee K, Lanske B, Segre GV. Parathyroid hormone-related protein and Indian hedgehog control the pace of cartilage differentiation. *J Endocrinol*. 1997;154 Suppl:S39-45.

Lacroix P. The Organization of Bones. 1951. Philadelphia: The Blakiston Co.

Langenskiöld A, Heikel HV, Nevalainen T, Osterman K, Videman T. Regeneration of the growth plate. *Acta Anat (Basel)*. 1989; 134 (2):113-23.

Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, Karperien M, Defize LH, Ho C, Mulligan RC, Abou-Samra AB, Jüppner H, Segre GV, Kronenberg HM. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science*. 1996 Aug 2;273(5275):663-6.

Long PH, Lee S.R., Experimental rickets in broilers: gross, microscopic and radiographic lesions. II calcium deficiency. *Avian Diseases*. 1984 28, 921-932.

Maatz R, Bauermeister A. A method of Bone Maceration Results in Animal Experiments. *J Bone Joint Surg*. 1957; 39: 153-166.

Mackie EJ, Tatarczuch L, Mirams M. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J Endocrinol*. 2011; 211(2):109-21.

Maeda Y, Nakamura E, Nguyen MT, Suva LJ, Swain FL, Razzaque MS, Mackem S, Lanske B. Indian Hedgehog produced by postnatal chondrocytes is essential for maintaining a growth plate and trabecular bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 10;104(15):6382-7. Epub 2007 Apr 4.

Mak KK, Chen MH, Day TF, Chuang PT, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling interacts differentially with Ihh signaling in controlling endochondral bone and synovial joint formation. *Development*. 2006 Sep;133(18):3695-707.

Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng*. 2007 May;13(5):947-55.

Martos-Rodríguez A, Santos-Alvarez I, Campo-Ruiz V, González S, García-Ruiz JP, Delgado-Baeza E. Expression of CCAAT/enhancer-binding protein-beta (C/EBPbeta) and CHOP in the murine growth plate. Two possible key modulators of chondrocyte differentiation. *J Bone Joint Surg Br*. 2003 Nov; 85(8):1190-5.

MayrJM, PiererGR, LinhartWE. Reconstruction of part of the distal tibial growth plate with an autologous graft from the iliac crest. *J Bone Joint Surg Br*. 2000 May;82(4):558-60.

McCarty RC, Xian CJ, Gronthos S, Zannettino AC, Foster BK. Application of autologous bone marrow derived mesenchymal stem cells to an ovine model of growth plate cartilage injury. *Open Orthop J*. 2010 Jun 23;4:204-10.

Miralles-Flores C, Delgado-Baeza E. Histomorphometric Analysis of the Epiphyseal Growth Plate in Rats after Prenatal Alcohol Exposure. *J Orthop Res*. 1992; 10: 325-336.

Moss-Salentijn L, Moss ML, Shinozuka M, Skalak R. Morphological analysis and computer-aided, three dimensional reconstruction of chondrocytic columns in rabbit growth plates. *J Anat*. 1987 Apr;151:157-67.

Nettelblad H, Randolph MA, Weiland AJ. Free microvascular epiphyseal-plate transplantation. An experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg [Am]* 1984;66(9):1421-30.

Nettelblad H, Randolph MA, Weiland AJ. Physiologic isolation of the canine proximal fibular epiphysis on a vascular pedicle. *Microsurgery* 1984;5(2): 98-101.

Nettelblad H, Randolph MA, Weiland AJ. Short term response of a skeletal growth plate to heterotopic microvascular transfer. *J Reconstr Microsurg* 1985;1(3):177-83.

Nettles DL, Chilkoti A, Setton LA. Early metabolite levels predict long-term matrix accumulation for chondrocytes in elastin-like polypeptide biopolymer scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2009 Aug;15(8):2113-21.

Oberbauer AM, Peng R. Growth hormone and IGF-I stimulate cell function in distinct zones of the rat epiphyseal growth plate. *Connect Tissue Res*. 1995;31(3):189-95.

O'Keefe RJ, Crabb ID, Puzas JE, Rosier RN. Effects of transforming growth factor-beta 1 and fibroblast growth factor on DNA synthesis in growth plate chondrocytes are enhanced by insulin-like growth factor-I. *J Orthop Res*. 1994;12:299-310.

Olsson. Bone in clinical Orthopedics, Summer Smith, B.v. ed. Philadelphia 1982.

Pachisium DM. Molecular Mechanisms regulating adult stem cell self-renewal. stem Cell Biology and regenerative Medicine. Donald G Phinney. Editor Adult Stem Cells. Biology and Methods of Analysis. Chapter 1, Humana Press 1<sup>st</sup> Ed, 2011. pp 3-33.

Pass C, MacRae VE, Ahmed SF & Farquharson C Inflammatory cytokines and the GH/IGF-I axis: novel actions on bone growth. *Cell Biochem Funct* 2009 27, 119-127.

Patel SA, Sherman L, Munoz J, Rameshwar P Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2008 Jan-Feb;56(1):1-8.

Pho RW. Free vascularized fibular transplant for replacement of the lower radius. *J Bone J Surg* 1979; 61B: 362–365.

Pho RW, Patterson MH, Kour AK, Kumar VP. Free vascularized epiphyseal transplantation in upper extremity reconstruction. *J Hand Surg* 1988;13B:440–447.

Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*. 2001 Feb 1;344(5):385-6.

Planka L, Gal P, Kecova H, Klima J, Hlucilova J, Filova E, Amler E, Krupa P, Kren L, Srnc R, Urbanova L, Lorenzova J, Necas A. Allogeneic and autogenous

transplantations of MSCs in treatment of the physeal bone bridge in rabbits. *BMC Biotechnol.* 2008 Sep 12;8:70.

Rankin EB, Giaccia AJ, Schipani E. A central role for hypoxic signaling in cartilage, bone, and hematopoiesis. *Curr Osteoporos Rep.* 2011 Jun;9(2):46-52.

Rank BK. Long-term results in epiphyseal transplants in congenital deformities of the hand. *Plast Reconstr Surg* 1978;61:321–329.

Ravindran S, Boyer MI, Martens E, Ntouvali H, McAlinden A. Assessment of epiphyseal plate allograft viability and function after ex vivo storage in University of Wisconsin Solution. *J Pediatr Orthop.* 2011 Oct-Nov;31(7):803-10.

Ring P. Transplantation of epiphyseal cartilage; an experimental study. *J Bone Joint Surg Br.* 1955 Nov;37-B(4):642-57.

Ring P. Excision and reimplantation of the epiphyseal plate of the Rabbit. *J Anat.* 1955 Apr;89 (2):231-7.

Ramón y Cajal S. Manual de Histología normal y de técnica micrográfica para uso de estudiantes. Imprenta y librería de Nicolás Mota. Madrid 1910.

Robertson WW. Basic Science and Pathology. Newest knowledge of the growth plate. *Clin Orthop Rel Res* 1990; 253:270-278.

Rodríguez-González JI. Anillo Pericondral Aportaciones experimentales y clínico-patológicas. Tesis doctoral Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina 1982.

Roach HI, Aigner T & Kouri JB Chondroptosis: a variant 1 of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis* 2004. 9, 265-277.

Romer A, Parsons J. Comparative Anatomy. 5<sup>th</sup> Ed, 1981, New Editorial. Interamericana, Mexico.

Romero-Prado M, Blázquez C, Rodríguez-Navas C, Muñoz J, Guerrero I, Delgado-Baeza E, García-Ruiz JP. Functional characterization of human mesenchymal stem cells that maintain osteochondral fates. *J Cell Biochem.* 2006 Aug 15;98(6):1457-70.

Sabbagh Y, Carpenter TO, Demay MB. Hypophosphatemia leads to rickets by impairing caspase-mediated apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jul 5;102(27):9637-42.

Santos S. Epifisiolisis. Análisis histométrico. Estudio experimental. Tesis doctoral Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina 1998.

Sánchez-Gil A. Trasplante articular. Estudio experimental. Tesis doctoral Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina 1994.

Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, Kobayashi T, Knight M, Johnson RS. Hypoxia in cartilage: HIF-1 $\alpha$  is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev.* 2001 Nov 1;15(21):2865-76.

Schipani E, Provot S. PTHrP, PTH, and the PTH/PTHrP receptor in endochondral bone development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2003 Nov; 69(4):352-62.

Seol JW, Lee HB, Lee YJ, Lee YH, Kang HS, Kim IS, Kim NS, Park SY. Hypoxic resistance to articular chondrocyte apoptosis--a possible mechanism of maintaining homeostasis of normal articular cartilage. *FEBS J.* 2009 Dec;276(24):7375-85.

Serra R, Karaplis A, Sohn P. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-dependent and -independent effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on endochondral bone formation. *J Cell Biol.* 1999;145:783-94.

Shapiro IM, , Srinivas V. Metabolic consideration of epiphyseal growth: survival responses in a taxing environment. *Bone.* 2007 Mar;40(3):561-7. Epub 2006 Dec 8.

Siffert RS. The growth plate and its affections. *J Bone Joint Surg Am.* 1966 Apr; 48(3):546-63.

Simon MC. Coming up for air: HIF-1 and mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 2006 Mar;3(3):150.

Stickens D, Behonick DJ, Ortega N, Heyer B, Hartenstein B, Yu Y, Fosang AJ, Schorpp-Kistner M, Angel P & Werb Z 2004 Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development* 2004. 131, 5883-5895.

Shapiro F, Holtrop ME, Glimcher MJ. Organization and cellular biology of the perichondrial ossification groove of ranvier: a morphological study in rabbits. *J Bone Joint Surg Am.* 1977 Sep;59(6):703-23.

Sobotta W. Histología 2º Edición. Editorial Médica Panamericana. 1ª ed 2009. Capítulo 2. La célula. 15-83.

Solomon L. Diametric growth of the epiphysial plate. *J Bone Joint Surg Br.* 1966 Feb;48(1):170-7.

Stark RH, Matloub HS, Sanger JR, Cohen EB, Lynch K. Warm ischemic damage to the epiphyseal growth plate: a rabbit model. *J Hand Surg Am.* 1987 Jan;12(1):54-61.

Stevenson S, Li XQ, Martin B. The fate of cancellous and cortical bone after transplantation of fresh and frozen tissue-antigen-matched and mismatched osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg Am* 1991;73-A: 1143-56.

Straub GF. Anatomical, Survival, Growth and Physiological Function of an Epiphyseal Bone Transplant. *Surgery, Gynecology and Obstetrics.* 1929; 48, 687.

Streeter M. A four-stages method of age at death. Estimation for use in the subadult rib cortex. *J Forensic Sci.* 2010, vol 55 (nº4):1019-1024.

Svedsen P, Hau J (Eds) Handbook of laboratory animals Science, vol II. *Animal models.* CRC Press. Boca Raton, FL 1994.

Svensson O, Hjerpe A, Reinholt FP, Engfeldt B. The effect of manganese ingestion, phosphate depletion, and starvation on the morphology of the epiphyseal growth plate. A stereologic study. *Clin Orthop Relat Res.* 1985 Jul-Aug;(197):286-94.

Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res.* 2012 Mar;22(3):457-72.

Tanck E. Cortical bone development under the growth plate is regulated by mechanical load transfer. *Journal Anat* 2006: 208, pp73-79.

Takato T, Harii K, Komuro Y, Yonehara Y. Experimental study on growth of epiphyseal plate: free graft in rabbits. *Br J Plast Surg.* 1993 Jul;46(5):416-20.

Terkorn SP, Bohensky J, Shapiro IM, Koyama E, Srinivas V. Expression of HIF prolyl hydroxylase isozymes in growth plate chondrocytes: relationship between maturation and apoptotic sensitivity. *J Cell Physiol.* 2007 Jan;210 (1):257-65.

Tamamura Y, Otani T, Kanatani N, Koyama E, Kitagaki J, Komori T, Yamada Y, Costantini F, Wakisaka S, Pacifici M, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J Biol Chem.* 2005 May 13; 280(19):19185-95.



Taylor GI, Miller GD, Ham FJ. The free vascularized bone graft. A clinical extension of microvascular techniques. *Plast Reconstr Surg* 1975;55:533–544.

Tonkin MA, Deva AK, Filan SL. Long term follow-up of composite non-vascularized toe phalanx transfers for aphalangia. *J Hand Surg Br.* 2005 Oct; 30(5):452-8.

Tomita Y, Tsai TM, Steyers C, Ogden L, Jupiter JB, Kutz JE. The role of the epiphyseal and metaphyseal circulations on longitudinal growth in the dog: an experimental study. *J Hand Surg Am.* 1986 May;11(3):375-82.

Trueta J, buhr AJ. The vascular contribution to osteogenesis. V. The vasculature supplying the epiphysial cartilage in rats *J Bone Joint Surg Br.* 1963 Aug;45:572-81.

Trueta J, Trias A. The vascular contribution to osteogenesis. IV. The effect of pressure upon the epiphysial cartilage of the rabbit. *J Bone Joint Surg Br.* 1961 Nov;43-B:800-13.

Trueta J, Barclay AE. Studies of the renal circulation. *Bristol Med Chir J* (1883). 1948;65(233):16-8.

Trueta J, Buhr AJ. The vascular contribution to Osteogenesis V. The vasculature supplying the epiphysial cartilage in rachitic rats. *J Bone Joint Surg Br.* 1963 Aug;45:572-81.

Trueta J, Morgan JD. The vascular contribution to osteogenesis. I. Studies by the injection method. *J Bone Joint Surg Br.* 1960 Feb;42-B:97-109.

Trueta J, Amato VP. The vascular contribution to osteogenesis. III. Changes in the growth cartilage caused by experimentally induced ischaemia. *J Bone Joint Surg Br.* 1960 Aug;42-B:571-87.

Trueta J, Little K. The vascular contribution to osteogenesis. II. Studies with the electron microscope. *J Bone Joint Surg Br.* 1960 May;42-B:367-76.

Urist M, McLean F. Osteogenetic Potency and New-Bone Formation by Induction in Transplants to the Anterior Chamber of the Eye. *J Bone Joint Surg.* 1952; 34-A, 4.

Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science.* 1996 Aug 2;273(5275):613-22.

Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, Ho AD. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One*. 2008 May 21;3(5):e2213.

Wang L, Shao YY, Ballock RT. Thyroid hormone-mediated growth and differentiation of growth plate chondrocytes involves IGF-1 modulation of beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res*. 2010 May; 25(5):1138-46.

Weise M, De-Levi S, Barnes KM, Gafni RI, Abad V, Baron J. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001. 98, 6871-6876.

Wilsman NJ, Farnum CE, Leiferman EM, Fry M, Barreto C. Differential growth by growth plates as a function of multiple parameters of chondrocytic kinetics. *J Orthop Res* 1996. 14, 927-936.

Whitesides ES. Normal growth in a transplanted epiphysis. Case report with thirteen-year follow-up. *J Bone J Surg* 1977;59A:546 –547.

Williams RM, Zipfel WR, Tinsley ML, Farnum CE. Solute transport in growth plate cartilage: in vitro and in vivo. *Biophys J*. 2007 Aug 1;93(3):1039-50.

Wingenfeld C, Egli RJ, Hempfing A, Ganz R, Leunig M. Cryopreservation of osteochondral allografts: dimethyl sulfoxide promotes angiogenesis and immune tolerance in mice. *J Bone Joint Surg Am*. 2002 Aug; 84-A(8):1420-9.

Wozney JM. Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res*. 1989;1(4):267-80.

Wu CW, Tchetina EV, Mwale F. Proteolysis involving matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) is required for chondrocyte differentiation that is associated with matrix mineralization. *J Bone Miner Res*. 2002; 17: 639–651.

Wuelling M, Vortkamp A. Transcriptional networks controlling chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification. *Pediatr Nephrol* 2010. 25, 625-631.

Zúñiga JM, Orellana JM, Tur JA. Ciencia y tecnología del animal de laboratorio. Universidad de Alcalá, Sociedad Española para las ciencias del animal de Laboratorio (SECAL). 2ª Ed 2011. 80-94.